台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.64 No.1 2015

Research Articles

1 Report on a New Invasive Species, *Pseudococcus dendrobiorum* Williams (Hemiptera: Pseudococcidae), in Taiwan
Shu-Pei Chen, Yi-Chung Chiu, Chien-Chung Chen, and Jen-Yu Wong

10 Development of an Efficient Fluorescent Visualization Method for the Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Infection in Rice Plants
Da-Gin Lin, Yu-Ling Lin, Chun-Wei Chen, Hui-Chen Lai, Yi-Wen Wang, Szu-Yi Chou, and Chang-Sheng Wang

21 Survey and Fungicides Screening for Mango Postharvest Disease Caused by *Phomopsis mangiferae*
Chiao-Wen Huang, Hong-Ren Yang, Ching-Yi Lin, Sui-Li Hsu, Su-Yu Lai, Wen-Chi Ko, and Hui-Fang Ni

32 Evaluation of Fungicides for Growth Inhibitions of *Phalaenopsis* Fusarium Pathogen
Jiunn-Feng Su, Yi-Ching Lee, Lan-Yi Chien, and Ting-Fang Hsieh

45 Identification of F_1 Hybrids in Watermelon Using SSR Markers
Jau-Yueh Wang and Min-Tze Wu

53 The Study of Pesticide Residues Control by the Combination of AChE Screening and Chemical Analysis: The Taipei Model
Edward Yun Cheng, Yu-Bing Huang, Ming-Yao Chiang, Yi-Hsuan Hou, and Chun-Chi Nien

Short Communications

64 Morphological Characterization of *Mangifera indica* L. in Taiwan
Hui-Lung Chiu, Jia-Yu Shin, and Kuo-Dung Chiou

74 Identification and Detection of *Cucumber mosaic virus* Isolated from Bloody Lily (*Haemanthus multiflorus*)
Chin-Chih Chen and Fen-Lang Chiang

ISSN 0022-4847

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.64 No.1 2015

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.64 No.1 2015

研究報告

1 台灣新入侵石斛粉介殼蟲 (半翅目：粉介殼蟲科) 初報
陳淑佩、邱一中、陳健忠、翁振宇

10 利用綠螢光標定 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 偵測水稻感病過程
林大鈞、林玉鈴、陳純葳、賴慧真、王怡雯、周思儀、王強生

21 由 *Phomopsis mangiferae* 引起之樣果採收後病害發生調查及防治藥劑篩選
黃巧雯、楊宏仁、林靜宜、許淑麗、賴素玉、柯文琪、倪蕙芳

32 殺真菌劑對蝴蝶蘭鐮胞菌屬病原菌的生長抑制效果評估
蘇俊峯、李怡靜、簡蘭懿、謝廷芳

45 利用 SSR 標誌進行西瓜雜交種之檢測
王昭月、吳明哲

53 生化及化學法聯檢之農藥殘留管理研究：北市模式
鄭允、黃毓斌、江明耀、侯怡亘、粘君綺

研究簡報

64 芒果 (*Mangifera indica* L.) 種原形態特性之調查與分析
邱輝龍、石家宇、邱國棟

74 胡瓜嵌紋病毒火球花分離株之鑑定與檢測
陳金枝、江芬蘭

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編（按筆劃序）

王強生／中興大學農藝系
申　雍／中興大學土壤環境科學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／苗栗區農業改良場
柯文雄／中興大學植物病理學系
侯豐男／中興大學昆蟲學系
郭鴻裕／農業試驗所農業化學組
高景輝／台灣大學農藝學系
陳世銘／台灣大學生物產業機電工程系
陳吉仲／中興大學應用經濟系
陳宗禮／中興大學農藝系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
陳福旗／屏東科技大學農園生產系
黃振文／中興大學植物病理學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／台灣大學園藝暨景觀學系
鄔宏潘／中央研究院植物暨微生物學研究所
曾夢蛟／中興大學園藝系
蔡致榮／農業試驗所
蔡新聲／朝陽科技大學生化科技研究所
歐錫坤／農業試驗所作物組
簡立賢／中興大學應用經濟系
蘇正德／東海大學食品科學系

編輯助理

李妙君／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳相君／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

台灣農業研究

第六十四卷　第一期　　　中華民國一〇四年三月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　陳駿季
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042

編印　Airiti Press Inc.
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新台幣一七五元
展售門市　1. 國家書店 / 10485 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02) 2518-0207
國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場 / 40042 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(1):1–9 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06401.01

Research Article

Report on a New Invasive Species, *Pseudococcus dendrobiorum* Williams (Hemiptera: Pseudococcidae), in Taiwan

Shu-Pei Chen[1,*], Yi-Chung Chiu[2], Chien-Chung Chen[3], and Jen-Yu Wong[4]

Abstract

Chen, S. P., Y. C. Chiu, C. C. Chen, and J. Y. Wong. 2015. Report on a new invasive species, *Pseudococcus dendrobiorum* Williams (Hemiptera: Pseudococcidae), in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 64(1):1–9.

A new invasive dendrobium mealybug, *Pseudococcus dendrobiorum* Williams (Hemiptera: Pseudococcidae), through imported orchids (*Phalaenopsis* spp.) from Vietnam was confirmed by Taiwan Agricultural Research Institute (TARI) in 2013. In this study, morphological characteristics and ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (rDNA-ITS1) sequence were used for the species identification and confirmation of the introduction source. A standard process for elimination and subsequent detection survey of this pest to prevent its spreading was executed by the Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine (BAPHIQ) based on the Plant Protection Act. No individual of this pest was found again during the later surveys. The slide-mounted voucher specimens were deposited in the Insect and Mite Museum, Division of Applied Zoology, TARI.

Key words: *Pseudococcus dendrobiorum*, *Pseudococcus longispinus*, Mealybugs, Invasive pest, Pest identification.

INTRODUCTION

Mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) are important pests of a wide variety of agricultural and ornamental plants (Williams & Granara de Willink 1992; Ben-Dov 1994). They damage plants by sucking sap from the vascular tissues, and cause leaf yellowing and plant stunting and wilting. Furthermore, excreted honeydews can cause black sooty mold and impair plant quality (Williams 2004; Chen *et al*. 2011a). Mealybug species are currently found on orchids (Orchidaceae) worldwide, including *Dysmicoccus orchidum* Williams, *Planococcus dendrobii* Ezzat & McConnel, *Planococcus philippinensis* Ezzat & McConnell, *Pseudococcus cryptus* Hempel, *Pseudococcus dendrobiorum* Williams, *Pseudococcus longispinus* (Targioni Tozzetti), and *Pseudococcus microcirculus* McKenzie (Ben-Dov & Miller 2014). Among these species, *Ps. longispinus* and *Ps. cryptus* are also distributed in Taiwan (Ben-Dov & Miller 2014). *Ps. longispinus* is a challenging pest causing serious damage to the aerial parts of orchids (Hsieh *et al*. 2011). *Ps. cryptus* is found on the aerial parts of *Ficus elastic* Roxb. and *Ficus microcarpa* L. (Tasi 2011), but never on orchids here. On the other

Received: August 4, 2014; Accepted: October 24, 2014.
* Corresponding author, e-mail: spchen@tari.gov.tw
1 Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Assistant Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Former Technician, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

hand, *Ps. dendrobiorum* is listed among the quarantine pests in many countries, but neither reported nor listed the same in Taiwan.

Psudococcus spp. are small and similar in morphology, and distinguished only by their adult female morphology due to the variable patterns and inconspicuous characteristics of egg, nymphs and male adult (Williams 2004). Quick and correct identification of an invasive pest is important to initiate effective control measures. Molecular identification under these circumstances is handy as it is not constrained by life stage, polymorphism, and gender (Williams *et al*. 1990; Loxdale & Lushai 1998). Molecular data are very useful for improving our understanding of phylogenetic relationships within taxonomic groups, and help discover and confirm new taxa or new invasive species (Correa *et al*. 2011; Abd-Rabou *et al*. 2012; Correa *et al*. 2012; Mani *et al*. 2013).

Orchids (Orchidaceae: *Phalaenopsis* spp.) are economically important flower crops in Taiwan. Certain invasive mealybug species may cause significant economic impacts on this crop. A suspected invasive mealybug species was reported in April 2013, from an orchid nursery located in the Changhua County with the cultivated orchids imported from Vietnam. The purpose of this study was to identify the species and confirm the introduction source of this pest with morphological characteristics and the ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 sequences (rDNA-ITS1). As the invasive status was confirmed, the Taiwan BAPHIQ, based on the Plant Protect Act, would trigger a standard process to eliminate and then regularly monitor this pest to protect local orchid cultivation environment.

MATERIALS AND METHODS

Morphological study

The new invasive mealybugs were collected by visual inspection of infested orchid plants (*Phalaenopsis* spp.), and placed in plastic net bags (30 cm × 45 cm), then labelled with collection data (localities, dates, and collectors). In the laboratory, morphological characteristics of the collected mealybugs were observed under a dissecting stereo microscope (Leica Z16 Apo Stereomicroscope, Switzerland) with digital charge-coupled device (Leica DFC 420 Digital Microscope Cameras, Switzerland), and compared with the *Ps. dendrobiorum* specimens collected from Vietnam. Slide-mounted female and immature specimens were made with Canada balsam using the methods described in Chen *et al*. (2011b). The adult female specimens were examined using an optical microscope (Leitz DMRB, Leica, Milton Keynes, U.K.) and digital images of morphological characteristics were taken using Leitz DMRB light microscope with Automatic Piezo stepping motor (Leica Piezo Z-drive, Switzerland) and Leica DFC 420 digital microscope camera (Leica, Switzerland). The morphological terms were based on the descriptions of Williams (2004) and Williams & Granara de Willink (1992). The slide-mounted specimens were deposited as vouchers in the Insect and Mite Museum, Division of Applied Zoology, TARI.

Molecular study

DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR), and sequencing: Sixteen specimens of the new invasive mealybug, 10 specimens of *Ps. dendrobiorum* from Vietnam, 18 specimens of *Ps. longispinus*, and 2 specimens of *Dysmicoccus brevipes* (served as an outgroup) were sampled. Live specimens were collected and stored in 95% ethanol. All specimens were identified to species based on morphological characteristics and the pertinent information listed in Table 1.

Genomic DNA was obtained from the individual whole specimen using the Blood and Tissue Genomic DNA Miniprep System Kit (Viogene Inc., Taiwan) following the extraction protocol established by the manufacturer. Precipitated DNA was resuspended in 100 μL

Table 1. Specimen names, collection data, lengths of ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 (rDNA-ITS1), and GenBank accession numbers of the mealybugs studied.

Specimen	Collection locality	Collection date	Host plant	Stage (No. of specimens)	Length of rDNA-ITS1 (bp)	GenBank accession numbers[z] rDNA-ITS1 variants (No. of specimens)
New invasive mealybug	Changhua, Taiwan	04/08/2013	*Phalaenopsis* sp.	Adults ♀ (8)	639	KJ767503 (6) KJ767504 (2)
		04/25/2013	*Phalaenopsis* sp.	Adults ♀ (4)	639	KJ767505 (3) KJ767506 (1)
				2nd instar (4)	639	KJ767505 (2) KJ767507 (1) KJ767508 (1)
Pseudococcus dendrobiorum	Lamdong, Vietnam	05/01/2013	*Phalaenopsis* sp.	Adults ♀ (2)	639	KJ767505 (1) KJ767509 (1)
				2nd instar (4)	639	KJ767510 (1) KJ767511 (1) KJ767512 (1) KJ767513 (1)
				1st instar (4)	639	KJ767505 (3) KJ767514 (1)
Pseudococcus longispinus	Taichung, Taiwan	03/16/2010	*Phalaenopsis* sp.	Adults ♀ (2)	590	KJ767500 (2)
		04/13/2010	*Phalaenopsis* sp.	Adults ♀ (2)	590	KJ767500 (2)
		04/29/2010	*Asplenium nidus*	Adults ♀ (2)	590	KJ767501 (2)
	Nantou, Taiwan	12/24/2010	*Rohdea japonica*	Adults ♀ (2)	592	KJ767502 (2)
	Yunlin, Taiwan	10/07/2011	*Anthurium scherzerianum*	Adults ♀ (2)	590	KJ767500 (2)
		04/26/2012	*Phalaenopsis* sp.	Adults ♀ (3)	590	KJ767500 (3)
	Taipei, Taiwan	05/25/2012	*Asplenium nidus*	Adults ♀ (2)	592	KJ767502 (2)
	Yunlin, Taiwan	05/07/2013	*Anthurium scherzerianum*	Adults ♀ (3)	590	KJ767500 (3)
Outgroup						
Dysmicoccus brevipes	Tainan, Taiwan	04/22/2007	*Musa sapientum*	Adults ♀ (2)	628	EU307273 (2)

[z] DNA sequences from different specimens with the identical nucleotides arrangement were incorporated into the same accession numbers.

of double-distilled (dd) H_2O, and then used to amplify the partial ribosomal RNA gene sequences with PCR.

Each PCR was carried out in a final volume of 50 μL with 25 μL of PCR Master Mix 2× (including 0.05 units μL^{-1} *Taq* DNA Polymerase in reaction buffer, 4 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTP) (MBI Fermentas Inc., EU), 5.0 μL of each 1.5 μM of primer, and 5 μL of extracted genomic DNA solution. PCR conditions were as follows: an initial denaturation step of 95℃(7 min), then 40 cycles of denaturation at 95℃(1 min), annealing at 56℃(1 min), and extension at 72℃ (2 min), followed by a final extension step at 72℃ (7 min). The primers used in this study were Amur18S-3 (5'-CGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTG-3') and ITS6 (5'-GAGCCGAGTGATCCACCGCT-3') (Chiu *et al*. 2001). The PCR products were run on 1.2% agarose gels in 1× TAE buffer to ensure correct amplification.

Amplified products were sent to the Mission Biotech Ltd. (Taipei, Taiwan) for purification and sequencing. Sequencing reactions were conducted using a 96-well Gel/PCR Clean Up Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) on an ABI 3730 DNA analyzer. The PCR products were sequenced in both directions and subsequently edited with Vector NTI Advance software v10.3 (Life Technologies Inc., USA). Sequence similarity analyses were conducted using the on-line programs (SeqWeb v3.1.2, http://bioinfo.nhri.org.tw:8003/mgr.shtml). Sequences were sent to the GenBank, and the accession numbers were given in Table 1.

Phylogenetic analyses: In order to determine the relationship between the 2 *Pseudococcus* taxa and the invasive mealybug, variants were used to infer the phylogenies with the neighbor-joining (NJ) method. The Phylip Version 3.695 (Felsenstein 2013) and the Kimura two-parameter model (Kimura 1980) were used to perform the NJ analyses. *D. bervipes* was used as an outgroup, and the bootstrapping values (Felsenstein 1985) determined with 1,000 repetitions were used to evaluate the clade support.

Fig. 1. *Phalaenopsis* orchids with infestation of the new invasive pest *Pseudococcus dendrobiorum* on roots.

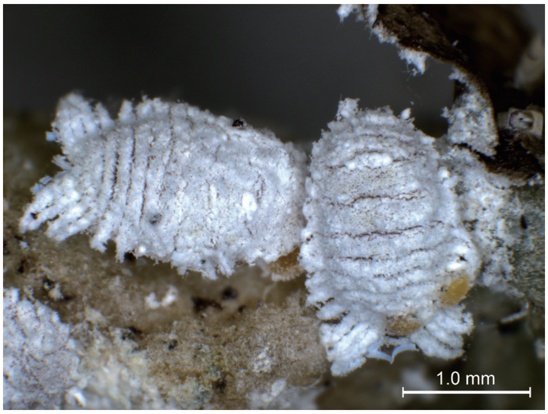

Fig. 2. Adult female of the new invasive pest *Pseudococcus dendrobiorum* Williams.

RESULTS AND DISCUSSION

A new invasive mealybug pest *Ps. dendrobiorum* Williams, which caused damages to the roots and aerial parts of orchids in Changhua County, was confirmed through a case study of TARI agricultural pest diagnostic service in April 2013 (Fig. 1). All specimens examined for morphology were as follows: Taiwan (Changhua County), 7♀, 08-IV-2013, TARI ex *Phalaenopsis* sp.; Taiwan (Changhua County), 7♀, 25-IV-2013, TARI ex *Phalaenopsis* sp.; Vietnam, 5♀, 01-V-2013, TARI ex *Phalaenopsis* sp.

Adults and immatures of this pest are grayish-pink in color, thin filaments around the body, caudal pair shorter than one half of the body length (Fig. 2). This pest does not possess long wax filaments on the tip of the abdomen, which is similar to the pineapple mealybug *D. brevipes* (Cockerell), but different from the longtailed mealybug *Ps. longispinus*. Other morphological characteristics include body of the female oval to elongate, antenna 8 segmented, oral collar tubular duct on the ventral head, legs well developed, translucent pores present on hind femur and hind tibia, cerarii 17 pairs, C_2 cerarii with 5 conical setae, 4 auxiliary setae and a group of trilocular pores, anal lobe cerari with 2 conical setae, and many trilocular pores on sclerotised area, sparse oral rim tubular ducts present medially on VI to VII abdominal segments, and multilocular disc

pores present on V to VII abdominal segments (Fig. 3). These morphological characteristics of the adult female match the descriptions of Ps. dendrobiorum given by Williams (2004), but differ from all other *Pseudococcus* spp. recorded in Taiwan (Tsai 2011; Ben-Dov & Miller 2014) in possessing oral collar tubular duct on the ventral head.

While *Ps. longispinus* (already distributed in Taiwan) infested only the aerial parts of orchids, this study found that the new invasive mealybug infested orchid roots and leaves. It has previously been recorded that Orchidaceae: *Coelogyne dayana*, *Dendrobium* sp., *Phalaenopsis amatilis*, *Raphioperdalum bellatulum*, *Spathoglottis* sp., *Spathoglottis plicata*, *Vanda teres*, in addition to Oleaceae: *Jasminum*; Pandanaceae: *Pandanus* sp., *Pandanus upoluensis*; and Passifloraceae: *Passiflora foetida,* and were among the host range of *Ps. dendrobiorum* (Ben-Dov & Miller 2014). The distributions of this mealybug species included

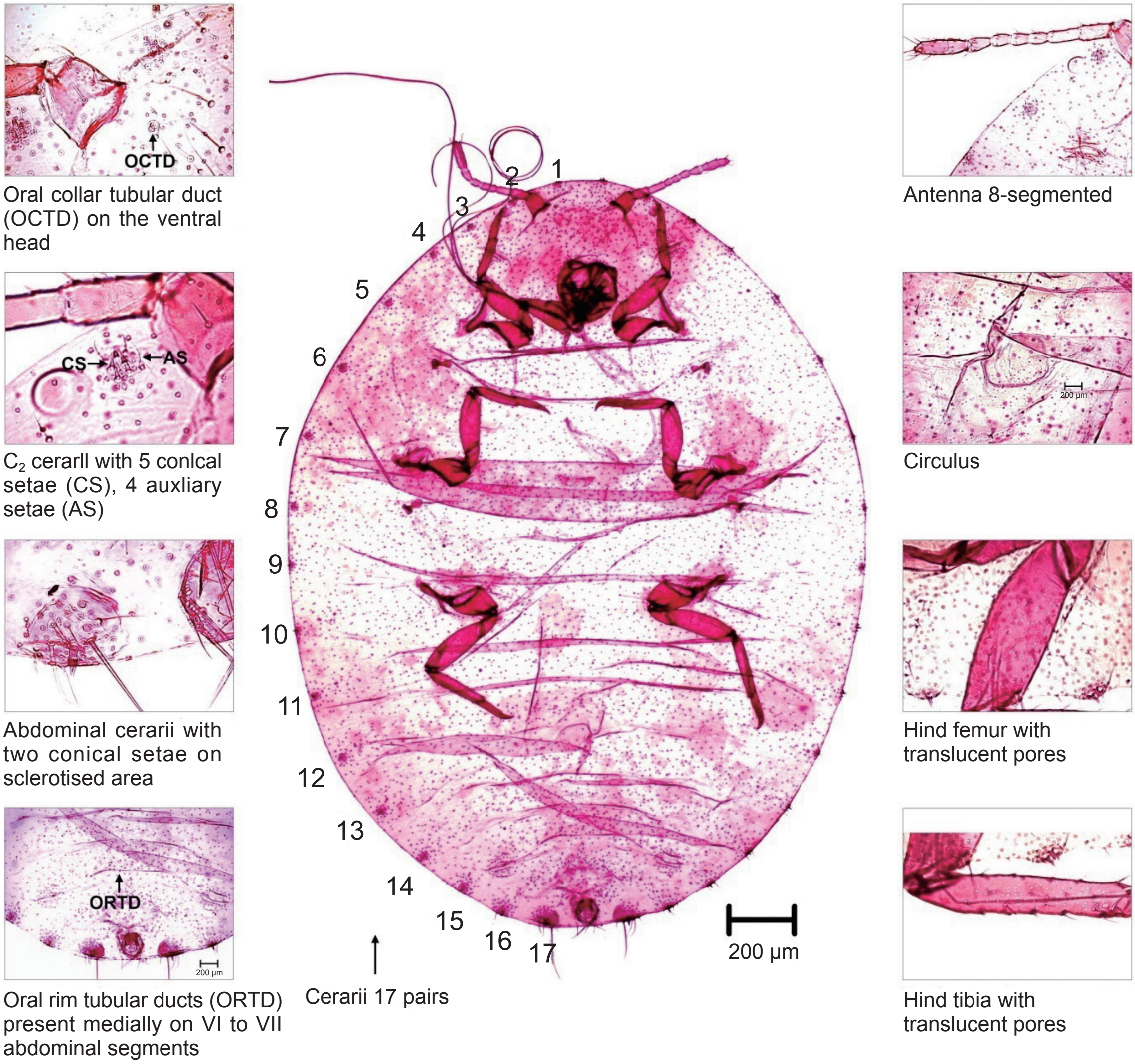

Fig. 3. Morphological characters used for identification of the new invasive pest *Pseudococcus dendrobiorum* Williams collected on orchids in Taiwan.

Australia (Northern Territory, Queensland), Guam, Hawaiian Islands (Hawaii, Oahu), India, Indonesia, Malaysia, Papua New Guinea, Philippines, Sri Lanka, South Korea, Thailand (Ben-Dov & Miller 2014), and Vietnam (newly recorded). These suggest that the suspected meanlybug is not the local species of *Ps. longispinus*, but most likely is being introduced together with the imported orchids from Vietnam.

In the molecular study, ribosomal DNA gene sequences were successfully amplified from all the specimens of adults and nymphs. The length of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) in both the invasive mealybug and the *Ps. dendrobiorum* from Vietnam was identical (639 aligned bp), while that in the *Ps. longispinus* was 590 (14 specimens) or 592 (4 specimens) aligned bp. With 15 variants identified, *Ps. dendrobiorum* (12 variants) was more variable than *Ps. longispinus* (3 variants) (Table 1). The ITS1 length was 628 bp for D. brevipes. This study showed that *Ps. dendrobiorum* could be distinguished from *Ps. longispinus* by the species-specific length of rDNA-ITS1.

Sequence similarity analysis of rDNA-ITS1 between inter- or intraspecies specimens indicated that the new invasive mealybug was highly similar to the *Ps. dendrobiorum* from Vietnam (similarity = 99.61%, parallel to the respective intraspecies similarities), but much less similar with the *Ps. longispinus* in Taiwan (similarity = 92.64%). The outgroup *D. brevipes* had the relatively lowest similarities with the samples of *Ps. dendrobiorum* (83.87%), the invasive mealybug (83.94%), and *Ps. longispinus* (84.00%) (Table 2). The phylogenetic tree (neighbor-joining tree) for gene sequences of the 3 mealybug species studied is shown in Fig. 4. All the *Ps. dendrobiorum* and *Ps. longispinus* sequences formed a single group, respectively. These phylogenetic results consistent with the morphological resolution suggest that the new mealybug pest and the *Ps. dendrobiorum* collected from Vietnam are the same species.

The frequency of mealybugs detected in the imported agricultural products through inspection programs conducted by Taiwan BAPHIQ is high (Chen *et al*. 2011b). In this study, the morphological characteristics and the rDNA-ITS1 sequences similarity analysis techniques were established to identify the species and confirm the introduction source of an invasive mealybug pest, which could cause damages to orchids. The combination of morphological and molecular characteristics has been broadly used as a robust technique for pest identification in recent years.

In our surveys, the damage of the invasive *Ps. dendrobiorum* to the orchids in Taiwan was limited to a single greenhouse in Changhua County. Although the economic impacts of this mealybug is difficult to estimate at this point as the information on its local ecology is lacking, *Ps. dendrobiorum* could be a challenging species and affect local export orchids (*Phalaenopsis* spp.) if they become established. In order to avoid proliferation of this invasive mealybug, Taiwan BAPHIQ has carried out a standard process in which the entire infested areas were sprayed with insecticide (44% Di-

Table 2. Mean percent similarities (± SD) among the new invasive mealybug, *Pseudococcus dendrobiorum* from Vietnam, *Pseudococcus longispinus* and *Dysmicoccus brevipes*, in the ITS1 sequence.

	New mealybug (Taiwan) (n = 16)	*Ps. dendrobiorum* (Vietnam) (n = 10)	*Ps. longispinus* (Taiwan) (n = 18)	*Dy. brevipes* (Taiwan) (n = 2)
New mealybug (Taiwan) (n = 16)	99.75 ± 0.18	99.61 ± 0.26	92.64 ± 0.19	83.94 ± 0.08
Ps. dendrobiorum (Vietnam) (n = 10)		99.53 ± 0.32	93.04 ± 0.67	83.87 ± 0.24
Ps. longispinus (Taiwan) (n = 18)			99.91 ± 0.10	84.00 ± 0.21
Dy. brevipes (Taiwan) (n = 2)				100.00 ± 0.00

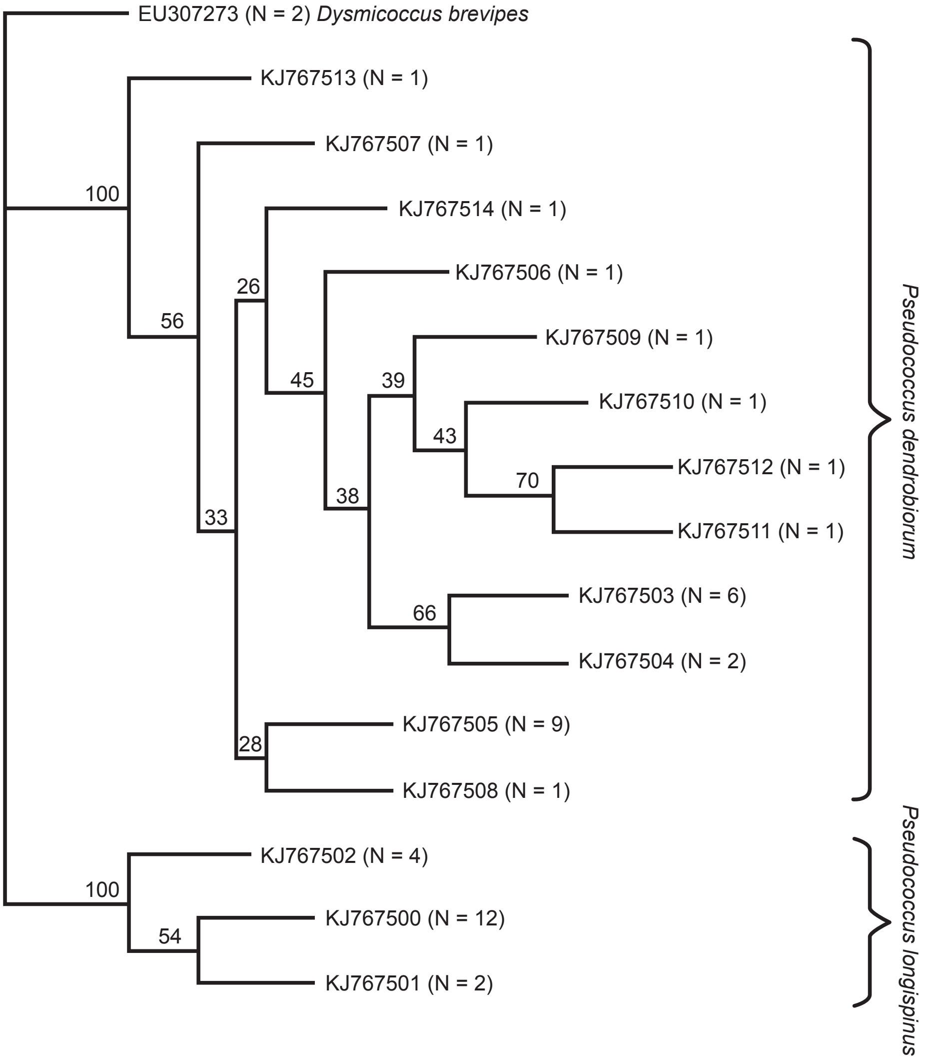

Fig. 4. Neighbor joining (NJ) tree with bootstrap support (1,000 replicates) showing clustering of *Pseudococcus* species for rDNA-ITS1 sequences. All *Ps. dendrobiorum* and *Ps. longispinus* sequences formed a single group, respectively. Bootstrap values are shown above the branches. "N" in the parenthesis indicates number of specimens. *Dysmicoccus brevipes* (EU307273) were used as an outgroup.

methoate EC 1,000×), and the infested plants, media, and containers were burned and destroyed to eliminate this pest. Regular detection surveys were also made subsequently to ensure its eradication, and no individuals were found again thereafter (Wu *et al*. 2014).

Farmers alertness combined with the TARI agricultural pest diagnostic service has been one of the major sources for gathering information about invasive pests in Taiwan, assisting official control programs to eliminate the pests before their establishment. In addition, this study provides basic information and digital archives of *Ps. dendrobiorum* for the TARI Digital Insects website (http://DigiPest.tari.gov.tw/), which is helpful to the taxonomic researchers, quarantine inspectors, and farmers in pest identification.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan ROC (grants 103AS-7.1.1-C1-C1(6) and 102AS-10.2.2-BQ-B6).

REFERENCES

Abd-Rabou, S., H. Shalaby, J. F. Germain, N. Ris, P. Kreiter, and T. Malausa. 2012. Identification of mealybug pest species (Hemiptera: Pseudococcidae) in Egypt and France, using a DNA barcoding approach. Bull. Entomol. Res. 102:515–523.

Ben-Dov, Y. 1994. A Systematic Catalogue of the Mealybugs of the World (Insecta: Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae and Putoidae) with Data on Geographical Distribution, Host Plants, Biology and Economic Importance. Intercept Limited. Andover. 686 pp.

Ben-Dov, Y. and D. Miller. 2014. Pseudoccidae. Part of ScaleNet. http://www.sel.barc. usda.gov/scalenet/scalenet.htm (visit on 12/2/2014)

Chen, S. P., W. J. Wu, and J. Y. Wong. 2011a. Damage diagnosis and identification of scale insects and case analysis. p.61–72. *in*: Proceedings of Symposium on Diagnosis and Identification of Plant Pest and Case Analysis. September 19, 2011. Chiayi, Taiwan. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei. (in Chinese with English abstract)

Chen, S. P., W. J. Wu, and J. Y. Wong. 2011b. Introduction of scale insects (Hemiptera: Coccoidea) intercepted from imported agricultural products in Taiwan. Plant Prot. Bull. 53:29–46. (in Chinese with English abstract)

Chiu, Y. C., W. J. Wu, and C. J. Shih. 2001. Identification of three *Aulacaspis* species (Homoptera: Diaspididae) by PCR-RFLP analysis for quarantine application. Formosan Entomol. 21:365–375. (in Chinese with English abstract)

Correa, M., C. Aguirre, J. F. Germain, P. Hinrichsen, T. Zaviezo, T. Malausa, and E. Prado. 2011. A new species of *Pseudococcus* (Hemiptera: Pseudococcidae) belonging to the "*Pseudococcus maritimus*" complex from Chile: molecular and morphological description. Zootaxa 2926:46–54.

Correa, M. C. G., J. F. Germain, T. Malausa, and T. Zaviezo. 2012. Molecular and morphological characterization of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Chilean vineyards. Bull. Entomol. Res. 102:524–530.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783–791.

Felsenstein, J. 2013. Phylogeny Inference Package (PHYLIP) Version 3.695. Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington. Seattle.

Hsieh, T. F., C. A. Chang, J. F. Su, and S. P. Chen. 2011. Chapter 9. Management and control of insects and diseases on *Phalaenopsis*. p.81–100. *in*: Cultivation Guide for *Phalaenopsis* in Sphagnum Moss. (Taiwan Pot-Plants Association ed.) Taiwan Pot-Plants Association. Taipei. 117 pp.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16:111–120.

Loxdale, H. D. and G. Lushai. 1998. Molecular markers in entomology. Bull. Entomol. Res. 88:577–600.

Mani, M., S. Joshi, M. Kalyanasundaram, C. Shivaraju, A. Krishnamoorthy, R. Asokan, and K. B. Rebijith. 2013. A new invasive jack beardsley mealybug, *Pseudococcus jackbeardsleyi* (Hemiptera: Pseudococcidae) on papaya in India. Florida Entomol. 96:242–245.

Tsai, M. Y. 2011. Mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) of Taiwan. [dissertation]. Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University. Taipei. 603 pp. (in English with Chinese abstract)

Williams, D. J. 2004. Mealybugs of Southern Asia. The Natural History Museum. London, UK Southdene SDN. BHD. Kuala Lumpur. 896 pp.

Williams, D. J. and M. C. Granara de Willink. 1992. Mealybugs of Central and South America. CAB International. London. 644 pp.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531–6535.

Wu, S. M., Z. F. Yin, R. J. Chang, and S. P. Chen. 2014. Notification and eradication of an orchid mealybug, *Pseudococcus dendrobiorum* Williams. Agric. World 367:104–105. (in Chinese)

台灣新入侵石斛粉介殼蟲 (半翅目：粉介殼蟲科) 初報

陳淑佩 [1,*] 邱一中 [2] 陳健忠 [3] 翁振宇 [4]

摘要

陳淑佩、邱一中、陳健忠、翁振宇。2015。台灣新入侵石斛粉介殼蟲 (半翅目：粉介殼蟲科) 初報。台灣農業研究 64(1):1–9。

本研究於 2013 年以形態特徵及核醣體 RNA 基因之 ITS1 (rDNA-ITS1) 序列相似性分析的多重比對資料，鑑定出蝴蝶蘭的新入侵害蟲石斛粉介殼蟲 [*Pseudococcus dendrobiorum* Williams (半翅目：粉介殼蟲科)]，並確認其來源地為越南。本粉介殼蟲玻片標本存放於行政院農委會農業試驗所應用動物組昆蟲標本館，作為我國入侵害蟲之存證標本，其資料可作為日後監測此種害蟲的依據。根據植物保護法，行政院農業委員會動植物防疫檢疫局進行滅絕及監測此害蟲的工作，迄今未再發現此害蟲。

關鍵詞：石斛粉介殼蟲、長尾粉介殼蟲、粉介殼蟲、入侵害蟲、害蟲鑑定。

投稿日期：2014 年 8 月 4 日；接受日期：2014 年 10 月 24 日。
[*] 通訊作者：spchen@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所應用動物組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所應用動物組研究員。台灣 台中市。
[4] 農委員農業試驗所應用動物組前技工。台灣 台中市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(1):10–20 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06401.02 研究報告

利用綠螢光標定 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 偵測水稻感病過程

林大鈞 [1,*] 林玉鈴 [2] 陳純葳 [3] 賴慧真 [2] 王怡雯 [4] 周思儀 [5] 王強生 [6,*]

摘要

林大鈞、林玉鈴、陳純葳、賴慧真、王怡雯、周思儀、王強生。2015。利用綠螢光標定 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 偵測水稻感病過程。台灣農業研究 64(1):10–20。

為能即時觀察白葉枯病菌於剪葉接種後感染水稻的完整過程，本研究利用新型強效的 *ZsGFP* 基因及 pBBR1MCS 載體，構築可於白葉枯病病原菌 *Xanthomonas* 中表現綠色螢光之重組質體 pBRRZsGFP。接著，轉型至 *Escherichia coli* DH5α 及 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b。經基因型確認之轉型菌株 ($DH5\alpha_{ZsGFP}$ 及 $XF89b_{ZsGFP}$) 菌落，皆可持續地表現綠螢光蛋白質。進一步於最高分蘖期接種水稻「台農67號」(感病品種) 植株，結果發現因葉綠素螢光的干擾，在接種 3 d 後 (3 DAI)，勉強可在切口處觀察到 $XF89b_{ZsGFP}$ 的增殖；直至 7 DAI，方能觀察 $XF89b_{ZsGFP}$ 自葉尖沿著葉脈向葉基入侵。為了降低葉綠素螢光的干擾，本研究改用「台農67號」暗培養之白化苗作為接種宿主，結果發現在感染 0.5 h，即可發現 $XF89b_{ZsGFP}$ 的增殖與入侵。在接種後 1 h，接種葉的螢光達到最大的表現。但可能隨水稻宿主啟動免疫系統，壓制入侵 $XF89b_{ZsGFP}$ 的繁殖，使接種葉的螢光表現轉弱。然而，至 7 DAI 接種葉的螢光表現轉強，並持續向病葉基部發展，顯示 $XF89b_{ZsGFP}$ 可能突破水稻的免疫系統，沿著維管束繼續侵入、繁殖，向葉片基部蔓延感染。這是目前已知最早觀測到白葉枯病菌感染水稻植株的研究報告。同時，此系統為非破壞性取樣，可連續在同一病葉觀察病原菌於接種後之侵入、增生及病勢的發展。因此，本研究所建構之 $XF89b_{ZsGFP}$，確實可作為即時檢測接種後病菌感染能力及感染過程的平台，亦能作為未來白葉枯病菌與水稻宿主間交互作用的檢測平台。

關鍵詞：白葉枯病菌、兔海葵綠螢光基因、*Xanthomonas* 螢光表現系統、病勢調查、病原菌 - 宿主間交互作用。

前言

水稻白葉枯病 (rice bacterial blight disease; RBBD) 是水稻的嚴重病害之一，主要是由 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 所引起，嚴重時可造成水稻的減產達 50% (Gnanamanickam *et al*. 1999)。此病害是一種系統性的疾病，主要危害水稻的葉片及葉鞘，甚至感染水稻的穗部，造成罹病株不充實粒的增加而減產。*X. oryzae* pv. *oryzae* 為桿狀黃色的革蘭氏陰性菌，長約 0.7–2.0 μm，寬約 0.4–0.7 μm。菌體可藉單一極性鞭毛，而具游走能力 (Yoshimura & Tahara 1961)。其主要是透過植株的傷口或自然開口 (如水口；hydathodes) 感染水稻植株，病原菌在木質部增殖後進而盤據在維管束，隨著菌體的增生胞外多醣體的分泌亦隨之增加，最後造成維管束系統的阻塞，使植

投稿日期：2014 年 8 月 4 日；接受日期：2014 年 10 月 14 日。
* 通訊作者：dagin@tari.gov.tw 及 wangchansen@nchu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[5] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。台灣 嘉義市。
[6] 國立中興大學農藝系副教授兼系主任。台灣 台中市。

株葉片白化乾枯 (Niño-Liu *et al*. 2006)。在感病初期，葉片的感染處會出現萎凋，且枯萎的區域亦會開始擴大；隨著病程的進展，在葉脈間區域會發生嚴重的壞疽 (necrosis)，接著整個罹病葉片轉成白灰色，最終死亡 (Mizukami & Wakimoto 1969; Niño-Liu *et al*. 2006)。

過去數十年，由於胞內細胞動力學 (*in vivo* cellular dynamics) 相關技術的發展，使學者對於特定生理現象探討更容易。綠螢光蛋白質 (green fluorescent protein; GFP) 自 1962 年於水母 (*Aequorea victoria*) 細胞中被發現 (Shimomura *et al*. 1962) 發展至今，已發展出許多不同形式的螢光蛋白質，如紅螢光蛋白質、黃螢光蛋白質及藍螢光蛋白質等。而以螢光蛋白質作為標誌系統 (marker system)，具有對細胞不易產生毒害及物理性破壞，且無需添加基質即可直接於活細胞 (*in vivo*) 中觀察等優點 (Tsien 1998; Errampalli *et al*. 1999)。因此，逐漸取代傳統的標誌基因 β-葡糖苷酸酶 (β-glucuronidase; *GUS*) 或螢光素酶 (luciferase) 基因，已被廣泛應用在生物物理學、生物化學、植物生理學及植物病理學等方面 (Mizuno *et al*. 2001; Stewart 2001; Hillesheim & Müller 2005; Caplan *et al*. 2008)。例如，利用螢光蛋白質標定待測定的蛋白質，即可在活細胞中以目視、追蹤，甚至量化此待測的蛋白質，並進一步探討其在細胞的生理功能 (Caplan *et al*. 2008)。另外，雙分子螢光互補分析 (bimolecular fluorescence complementation; BiFC) 分析技術，是利用不同螢光系統，標定不同的待測蛋白質，藉此在植物或動物細胞中分析標的蛋白質間的交互作用 (Bracha-Drori *et al*. 2004; Chun *et al*. 2007)。近來，螢光蛋白質已被利用在微生物的標定，藉此分析它們在宿主的感染過程，如 *Lactobacillus sakie*、*Pseudomonas syringae*、*X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* 及 *Xylella fastidiosa* 等 (Newman *et al*. 2003; Elibox & Umaharan 2007; Yu *et al*. 2007; Fan *et al*. 2008)。

為了研究白葉枯病菌與宿主水稻的交互關係，以了解病原菌的致病性或是水稻宿主的抗性。現行的做法是利用剪葉接種法，對分櫱盛期的水稻，接種白葉枯病菌。並於判別品系「台中在來 1 號」(‘Taichung Native 1’; ‘TN1’) 的病斑發展至全葉面積 3/4 (或約 20 cm 長) 時，針對供試水稻品種 (系) 進行病斑的量測 (Kauffman *et al*. 1973)。然而，由於 *X. oryzae* pv. *oryzae* 之繁殖較為緩慢，通常需要接種 7 d 以上，方能觀察到病斑表現。而田間接種又經常受到當時田間的環境因素所影響，接種成功與否的判定，常需要觀察到宿主葉片出現病斑或是測定菌流方能確定。所以，一旦接種失敗，常導致錯失當期作的最佳接種時機。因此，如何能盡早確定病原菌接種成功與否，係水稻病害檢定非常重要的關鍵技術。

近年來，Matz *et al*. (1999) 自兔海葵 (*Zoanthus* sp.) 選殖出一強效的綠螢光基因 *ZsGFP*，可表現較前述的 EGFP 高 2.5 倍的螢光強度，適用在細胞標定、啟動子表現強度研究、蛋白質體研究或轉染的控制等相關試驗 (Clontech Co., USA)。因此，本研究利用 *ZsGFP* 基因，構築成 *Xanthomonas* 之綠螢光基因連續表現系統，並轉型至台灣水稻白葉枯病抗性檢定圃專用菌株 XF89b，使其能持續地表現 ZsGFP 綠螢光蛋白質。繼而利用此一重組 $XF89b_{ZsGFP}$ 菌株感染「台農 67 號」水稻植株，發現於接種後即可即時觀察病原菌的感染過程。因此，本研究建立一個可於病原菌接種後立即檢測白葉枯病菌感染過程之可信且快速的方法，除了可即時提供接種成功與否的訊息外，亦可作為日後探討白葉枯病菌-水稻宿主間交互作用的分析平台。

材料與方法

試驗材料

本研究使用對白葉枯病原菌呈感病反應的水稻品種「台農 67 號」(‘TNG 67’) 為試驗材料，分別依慣行農法種植於溫室之正常植株，以及種子播種於培養基進行暗處理所得之白化苗做為接種材料。白葉枯病菌則以行政院農委會農業試驗所植病組稻作病害實驗室所保存的白葉枯病菌株 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b (採集地：台中) 作為供試菌株。而 *Escherichia*

coli DH5α 則為 DNA 重組試驗用之宿主。表現系統構築所用之載體為 pBBR1MCS，其是一種可存於大多數革蘭氏陰性菌宿主 (gentamycin 敏感菌株) 的選殖載體，如 *E. coli*、*Xanthomonas* 屬、*Acetobacter xylinum*、*Bartonella bacilliformis*、*Paracoccous denitrificans*、*Pseudomonas fluorescens*、*P. putida*、*Rhizobium meliloti*、*Salmonella typhimurium* 及 *Vibrio cholerae* 等菌株 (Kovach *et al*. 1995)。報導基因 *ZsGFP* 綠螢光基因則購自 Clontech 公司之商品 pZsGreen1 (Clontech Co.)。

Xanthomonas 綠螢光表現系統之構築

依據已發表之 *ZsGFP* 基因序列 (Matz *et al*. 1999)，設計引子：GFP-F 5'-TATAGGGCGAATTGGTGGCACGACAGGTTTCCCGA-3' 及 GFP-R 5'-GAACAAAAGCTGGTCCCGGCATCCGCTTACAGA-3'。以 pZsGreen 質體 DNA 為模板，PCR 程式設定為 95℃ 2 min 30 s 1 循環，94℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 3 min 循環 30 次，72℃ 10 min 1 循環，擴殖出含啟動子及 *ZsGFP* 綠螢光基因片段，再以 In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Co.)，次選殖於 pBBR1MCS 的 *Sac*I 及 *Kpn*I 切位。根據 Cohen *et al*. (1972) 發表的方法，將反應產物轉型至 *E. coli* DH5α。經定序確認為帶有正確啟動子插入片段之重組質體，即命名為 pBBRZsGFP。本研究將所獲得之重組菌株 *E. coli* DH5α (pBBRZsGFP)，簡稱為 $DH5\alpha_{ZsGFP}$。接著，利用 Mini Plus™ Plasmid DNA Extraction System (Viogene, Taiwan) 抽取 pBBRZsGFP 質體，供後續白葉枯病菌轉型用。

白葉枯病菌之轉型 (Transformation)

利用電穿孔方法進行 *X. oryzae* 轉型 (Keen *et al*. 1992)。首先，自活化的 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b，挑選單一菌落培養於 50 mL PSG 培養基 [500 g L^{-1} 馬鈴薯、200 g L^{-1} 蔗糖、15 g L^{-1} peptone、5 g L^{-1} $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 及 2 g L^{-1} $Ca(NO_3)_2$]，於 30℃、150 rpm 下，震盪培養至 A_{600} 讀值達 0.6–0.8，隨即冰浴 30 min 後以 5,000 ×*g*、4℃、離心 5 min 收集菌體。接著，將菌體輕輕懸浮於 50 mL 預冷的 10% 甘油，再以上述離心條件沉降菌體。重複此步驟 2 次後，所得菌體即輕輕懸浮於 1 mL 預冷的 10% 甘油，並以 100 μL 分裝於 1.5 mL 微量離心管，即為勝任細胞 (competent cell)。經液態氮急速冷凍後，保存於 -80℃ 備用。

轉型時，將勝任細胞自 -80℃ 中取出，加入適量的質體 DNA，置於冰上緩慢回溫後，移至預冷之電極管中 (Bio-Rad®, USA, 0.2 cm)。同時，將 Gene Pulser® II (BIO-RAD®) 的反應條件設定在 25 μF、2.4 kV 與 200Ω，進行電穿孔後，將菌液轉移到 0.45 mL 的 PSG 培養基，於 30℃ 下培養 1.5–2.0 h。最後把菌液均勻塗佈於含 10 mg L^{-1} gentamycin 的 523 固態培養基 [1% (w/v) sucrose、0.8% (w/v) casein hydrolysate、0.4% (w/v) yeast extract、0.2% (w/v) K_2HPO_4、0.03% (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 及 1.5% (w/v) agar] (Kado & Heskett 1970)，進行篩選。經基因型分析及螢光觀察所確認的重組菌株，即為 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b (pBBRZsGFP)，以下簡稱為 $XF89b_{ZsGFP}$。

轉型株之基因型分析

以牙籤自選擇性固態培養基上，挑取單一菌落之 *E. coli* 與 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 之轉型株，一方面接種至新鮮含 10 mg L^{-1} gentamycin 的 LB 固態培養基 [1% (w/v) bacto trytone、0.5% (w/v) yeast extract、1% (w/v) sodium chloride 及 1.5% agar]，作為平板菌保；另一方面，將菌體置於 PCR 反應液，進行 colony PCR，確認轉型株帶有 pBBRZsGFP。PCR 所用引子為：GFP-F1 5'-GACTACGCGTATGACCATGATTACGCCAAGCT-3' 及 GFP-R1 5'-GACTGAGCTCGACTAGTAGGCC TATTATTTTGT-3'。

PCR 程式設定為 95℃ 4 min 30 s 1 循環，94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 3 min 循環 30 次，72℃ 10 min 1 循環，擴增出 0.8 kb *ZsGFP* 綠螢光基因片段。

白葉枯病菌之接種源製備、接種與病勢調查

在接種源製備方面，將 *X. oryzae* pv. *ory-*

zae XF89b、XF89b$_{ZsGFP}$ 於室溫下、523 固態培養基上活化培養 72 h 後，再挑選單一菌落畫線接種於新鮮培養基，於室溫下進行馴化培養 72 h。接著，轉移至 523 液體培養基 (1% sucrose、0.8% casein hydrolysate、0.4% yeast extract、0.2% K_2HPO_4 及 0.03% $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$)。於室溫下、150 rpm 震盪培養 72 h。此時菌液濃度約 10^9 CFU mL^{-1}，即可作為白葉枯病菌之接種源。另一方面，DH5α$_{GFP}$ 則於 37℃下，於 LB 固態培養基培養 2 d，即將菌體刮下並懸浮於滅菌去離子水，調整菌液 A_{600} 讀值至 0.6–1.0，即為大腸桿菌之接種源。

供試水稻植株於溫室種植至最高分櫱期 (maximum tillering stage，約 60–80 d)，即依據 (Kauffman *et al*. 1973) 所發表的剪葉接種法 (leaf clipping method)，將白葉枯病病原菌接種至水稻植株。接種前，先將消毒的剪刀刀刃沾滿接種源菌液，接著進行人工剪葉接種，每個分櫱僅接種最上位之完全展開葉 (距葉尖 1–2 cm 處)。所有剪葉接種均在 1 h 內完成。

本研究之傳統病勢觀察，分為病斑發展及菌流生成兩部分。前者於接種後 0 h、0.5 h、1 h、2 h、6 h、1 DAI (day after inoculation)、2 DAI、3 DAI、5 DAI、7 DAI、14 DAI 及 21 DAI 等時間點，量測並記錄病斑發展的長度。同時，利用消毒刀片自與切口垂直方向，切出 0.1 cm^2 的葉片組織，放置於光學顯微鏡下，以 100× 放大倍率觀察菌流的形成與否，以判定病原菌在維管束之繁殖與盤據的情形。

白葉枯病菌感染水稻過程的螢光觀察

供試「台農 67 號」水稻植株，以剪葉法 (Kauffman *et al*. 1973)，分別接種 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b、XF89b$_{ZsGFP}$ 及 DH5α$_{ZsGFP}$ 後，即於 0 h、0.5 h、1 h、2 h、6 h、1 DAI 及 7 DAI 等時間點，利用螢光解剖顯微鏡 (Zeiss Stemi SV6, Carl Zeiss)，觀察接種葉片的螢光表現。螢光部分的照射光源為 470–490 nm 的藍光，激發的螢光則經由 505–530 nm 濾鏡過濾後，進入接目鏡呈像，觀測影像再利用 Nikon 995 數位相機拍攝記錄結果。

結果與討論

Xanthomonas 綠螢光表現系統之構築與表現

Soby & Daniels (1996) 指出大腸桿菌的乳糖操作子 (*lac* operon)，在同為 *Xanthomonas* 屬的 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 菌株中，可正常大量表現，但不受葡萄糖的抑制或 isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導。為構築可在 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 中可大量且連續表現的螢光表現系統，本研究先自 pZsGreen 質體，分別以 PCR 方法，擴增 1,146 bp 包含完整 *lac* 啟動子、CAP 結合部位及 *ZsGFP* 閱讀框架 (open reading frame) 的 DNA 片段，以 in-fusion cloning 的方式次選殖於 pBBR1MCS (Kovach *et al*. 1995)，得到重組表現質體 pBBRZsGFP (圖 1)。

將 pBBRZsGFP 重組質體轉型至 *E. coli* DH5α 後，以含 10 mg L^{-1} gentamycin 的 LB 固態培養基篩選培養後，挑取單一菌落，經 colony PCR 之 *GFP* 基因分析發現，大部分轉型株均能擴增出符合預期的 0.8 kb PCR 產物 (圖 2A)。經確認為 DH5α$_{GFP}$ 之重組菌株，再直接利用螢光解剖顯微鏡觀測，結果發現 pBBRZsGFP 無須乳糖或 IPTG 的誘導，即可在大腸桿菌中表現具有功能的 ZsGFP 蛋白質，使其菌落發出綠螢光 (圖 2C)。此結果可能肇因於選殖時，插入片段 DNA 並未包含抑制子結合部位 (repressor binding site, *lacI*)。因此，pBBRZsGFP 在大腸桿菌宿主中，是一種持續表現 (constitutive expression) 的重組質體。

同樣的步驟，將 pBBRZsGFP 表現重組質體轉型至 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 後，經由含 10 mg L^{-1} gentamycin 的 523 固態培養基篩選，並挑取單一菌落，以 colony PCR 進行 *GFP* 基因檢測亦發現，大部分轉型株均能擴增出預期的 PCR 產物 (圖 2B)。利用螢光解剖顯微鏡，觀測確認之 XF89b$_{ZsGFP}$ 重組菌株的螢光反應，發現 pBBRZsGFP 在白葉枯病菌的細胞中，亦可持續表現具有功能的 ZsGFP 蛋白質，使菌落發出綠螢光 (圖 2D)，與 Soby & Daniels (1996) 所發表的結果類似，即 *lac* 啟

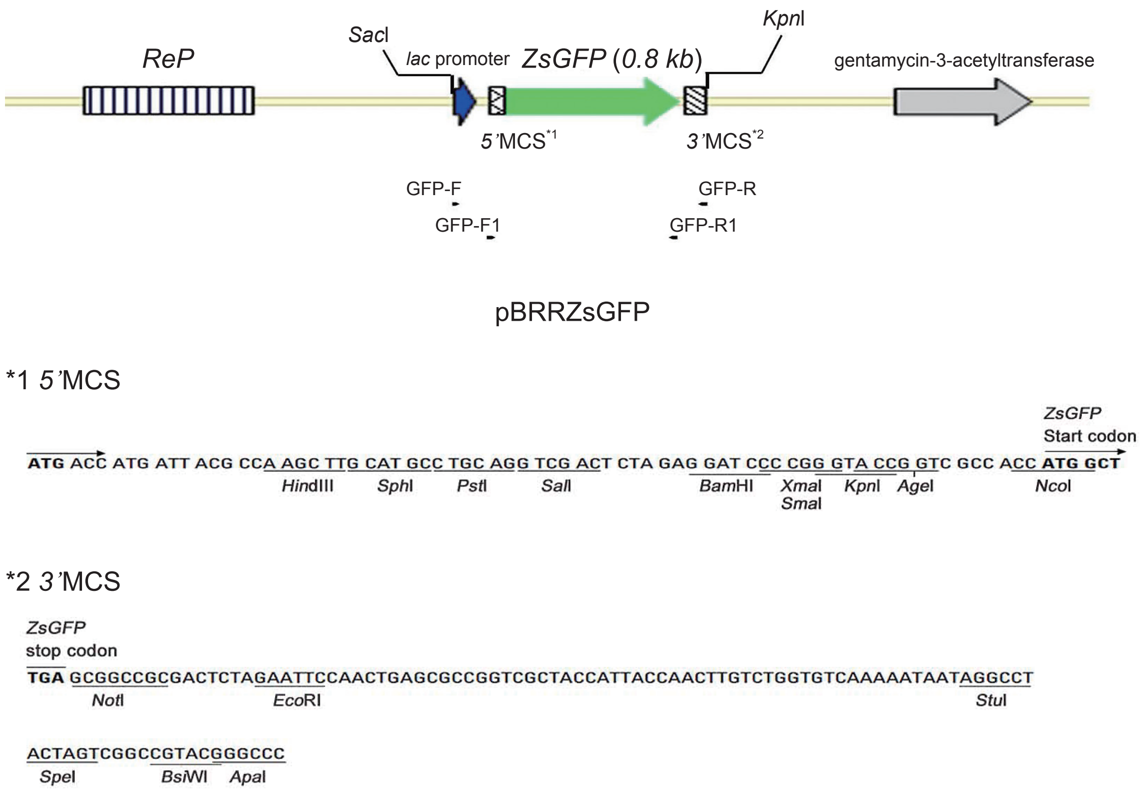

圖 1. *Xanthomonas* 綠螢光基因表現系統 pBRRZsGFP 之構築。Rep 為複製起始點；GFP-F、GFP-R、GFP-F1 及 GFP-R1 為本篇報告所用引子；gentamycin-3-acetyltransferase 則為篩選標誌基因。GFP 為水母綠螢光蛋白質。

Fig. 1. The construction of *Xanthomonas* expression system of the green fluorescent protein gene, pBRRZsGFP. Rep was indicated the replication origin. GFP-F, GFP-R, GFP-F1 and GFP-R1 were indicated the primers used in this work. The gentamycin-3-acetyltransferase is the selective marker gene. GFP: jellyfish green fluorescent protein.

動子亦可在 *Xanthomonas* 屬的宿主細胞持續性的大量表現。因此，本研究所得的重組菌株 DH5α$_{ZsGFP}$ 及 XF89b$_{ZsGFP}$，確實可以持續地在所屬菌株內大量表現綠螢光蛋白質，並極容易觀察。因此，本試驗應用這兩株菌株，建立白葉枯病菌感染水稻植株之高效視覺化的觀察系統，做為解決傳統病斑觀察或菌流觀察耗時與不確定等問題。

白葉枯病菌之接種與感染過程的觀察

現行白葉枯病的接種，大多利用剪葉法來進行 (Kauffman *et al*. 1973)。接著，觀察病葉之病斑進程與菌流發展，進而分析白葉枯病菌的感染過程 (圖 3)。結果發現，「台農 67 號」在接種 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 120 h 後，才能在病葉上觀察到病斑的形成。而菌流的觀察，則可在接種 48 h 後，可在接種葉上觀察到菌流。但菌流的觀察為破壞性取樣，因此無法於後續時間點，繼續觀察同一病葉的病徵變化。另一方面，目前探討水稻與白葉枯病菌間交互作用的功能性基因體學研究，多聚焦在接種 12、24 及 72 h (Mahmood *et al*. 2006; Chen *et al*. 2007)。在其他植物，如阿拉伯芥，被發現在更早的時間點，宿主即能啟動免疫反應，因應病原菌的入侵 (Zipfel *et al*. 2004)。但現行的觀察方法，卻無法在感染初期，觀察到任何可配合功能性基因體學分析的外表型 (phenotype) 改變。

因此，本研究利用上述螢光標定的 XF-89b$_{ZsGFP}$，接種最高分蘗期的「台農 67 號」水稻植株，再利用 Zeiss Stemi SV6 螢光解剖顯微鏡，觀察 XF89b$_{ZsGFP}$ 入侵水稻宿主的進程。

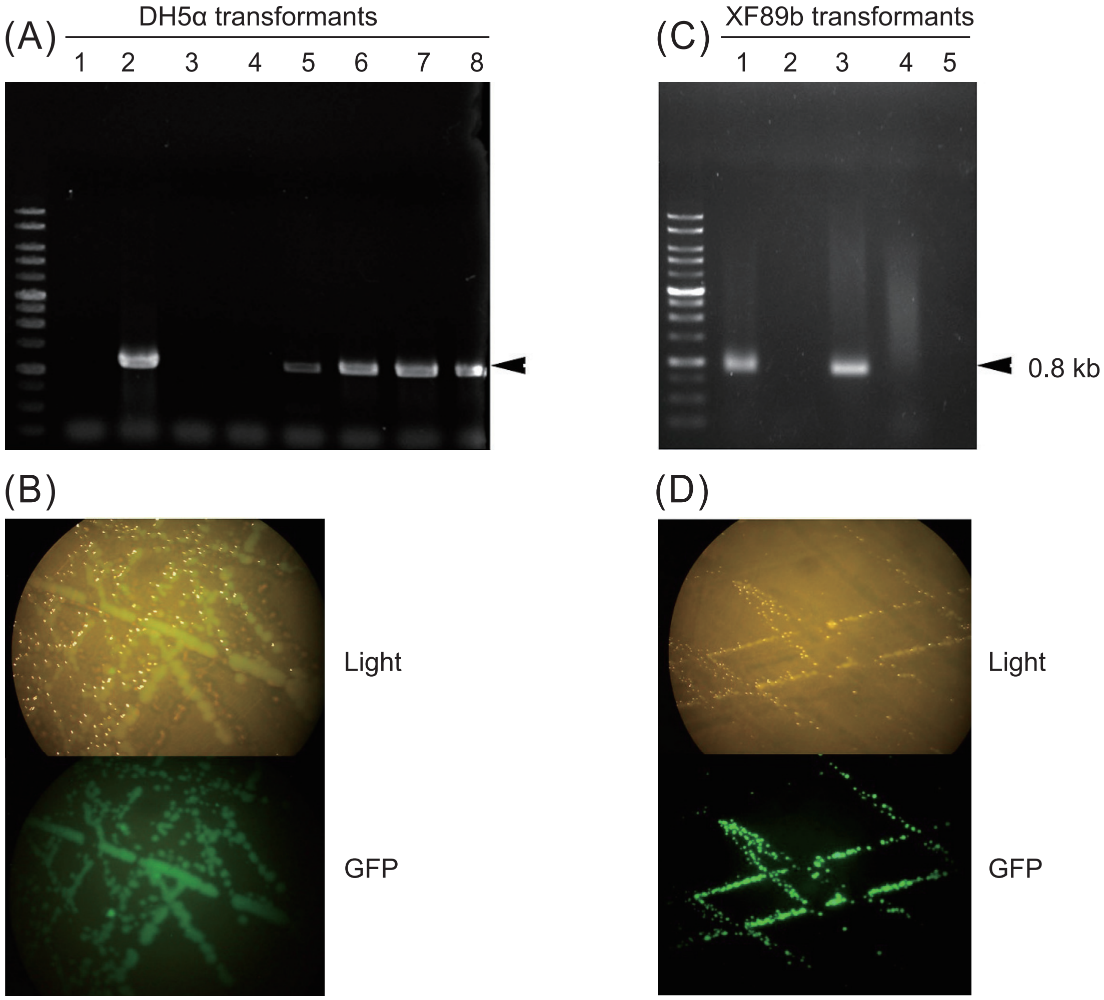

圖 2. *ZsGFP* 基因在 *Escherichia coli* 及 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 宿主中之表現。DH5α$_{ZsGFP}$ 及 XF89b$_{ZsGFP}$ 之 GFP 基因型分析 (A、C)；DH5α$_{ZsGFP}$ 及 XF89b$_{ZsGFP}$ 之螢光觀察 (B、D)。(A) Lanes 1–8 為轉形大腸桿菌 DH5α 之菌落 PCR 分析結果；(C) Lanes 1–5 為轉形白葉枯病菌 XF89b 之菌落 PCR 分析結果；(B、D) Light：白光下之觀察，GFP：螢光下之觀察。

Fig. 2. The expression of *ZsGFP* gene in *E. coli* and *X. oryzae* pv. *oryzae*. Genotyping of DH5α$_{ZsGFP}$ and XF89b$_{ZsGFP}$ (A, C); visualization of DH5α$_{ZsGFP}$ and XF89b$_{ZsGFP}$ expressing GFP (B, D). (A) Lanes 1–8 displayed the colony PCR results of *E. coli* DH5α transformants; (C) Lanes 1–5 displayed the colony PCR results of *X. oryzae* XF89b transformants; (B, D) Light: the observation under white light; GFP: the observation under fluorescence.

結果發現 3 DAI 時，在葉片切口即能觀測到螢光的表現。5 DAI 時，螢光部份已沿著葉脈向葉片基部移動 (圖 4)。然而，在此觀測條件下，葉綠素會受激發呈現紅色螢光，導致葉片在觀測時呈現紅色，嚴重干擾綠螢光的觀察。

為排除葉綠素螢光的干擾，改以暗培養所得的白化苗，進行 XF89b$_{ZsGFP}$、DH5α$_{ZsGFP}$ 及 XF89b 的接種，並於接種 0、0.5、1、2、6、24 h 及 7 DAI 時，連續觀測 3 個病葉的螢光表現 (圖 5)。結果發現，在接種 0 h，即可觀測到 XF89b$_{ZsGFP}$ 重組菌株在切口處有螢光表現；0.5 h，可觀測到 XF89b$_{ZsGFP}$ 重組菌株，由切口處沿著葉脈向葉片基部移動；1 h，XF89b$_{ZsGFP}$ 可在病葉上大量繁殖，可觀測到極為明顯的螢光訊號。接著，在 2、6 及 24 h，仍可持續觀察到 XF89b$_{ZsGFP}$ 向基部移動，但螢光訊號卻較

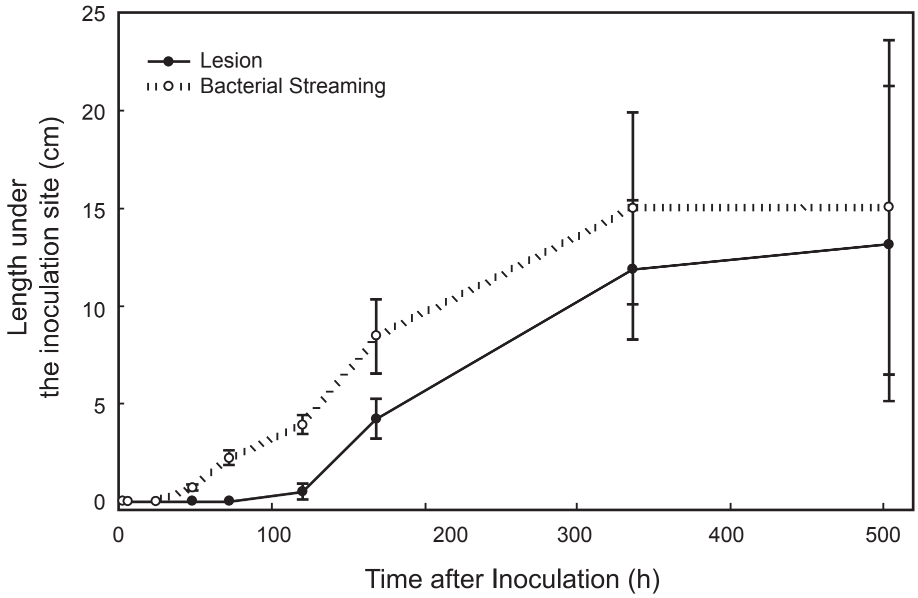

圖 3. 水稻植株接種 XF89b (0、0.5、1、2、6、24、48、72、120、168、336 及 504 h) 之病斑長度及菌流位置。

Fig. 3. The lesion length (cm) and bacterial streaming sites of rice plants inoculated with XF89b and investigated at 0, 0.5, 1, 2, 6, 24, 48, 72, 120, 168, 336 and 504 hours after inoculation.

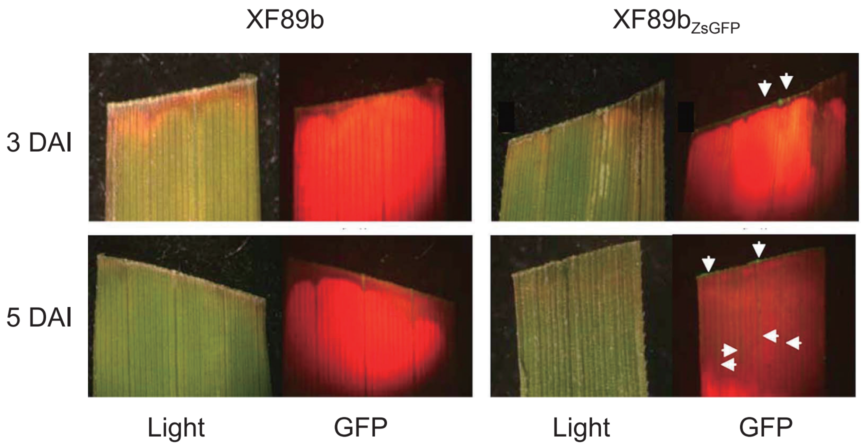

圖 4. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 在感染最高分蘗期水稻過程之表現螢光觀察。

Fig. 4. Visualization of *X. oryzae* pv. *oryzae* expressing GFP at 3 DAI and 5 DAI after inoculation of rice at the maximum tillering stage. GFP: jellyfish green fluorescent protein; DAI: day after inoculation.

感染 1 h 弱。此現象可能是因為在這段時間，水稻啟動免疫防禦機制，抑制 XF89b$_{ZsGFP}$ 的繁殖，致使螢光訊號的減弱。但到了 7 DAI 時，XF89b$_{ZsGFP}$ 可能已壓抑了水稻的免疫系統，不僅沿著維管束大肆向病葉基部入侵，更在病葉上大量繁殖，因此可在病葉觀察到極強的螢光訊號 (圖 5)。同時，在 7 DAI 時，亦可在同一接種葉上觀察到明顯病斑的形成。然而以 DH5α$_{ZsGFP}$ 或 XF89b 接種，皆無法在病葉上觀察到螢光。推論大腸桿菌無法在病葉上繁殖與入侵，因此在所有觀測點皆無法觀察到螢光的表現；而後者則因不帶有螢光基因，所以也未

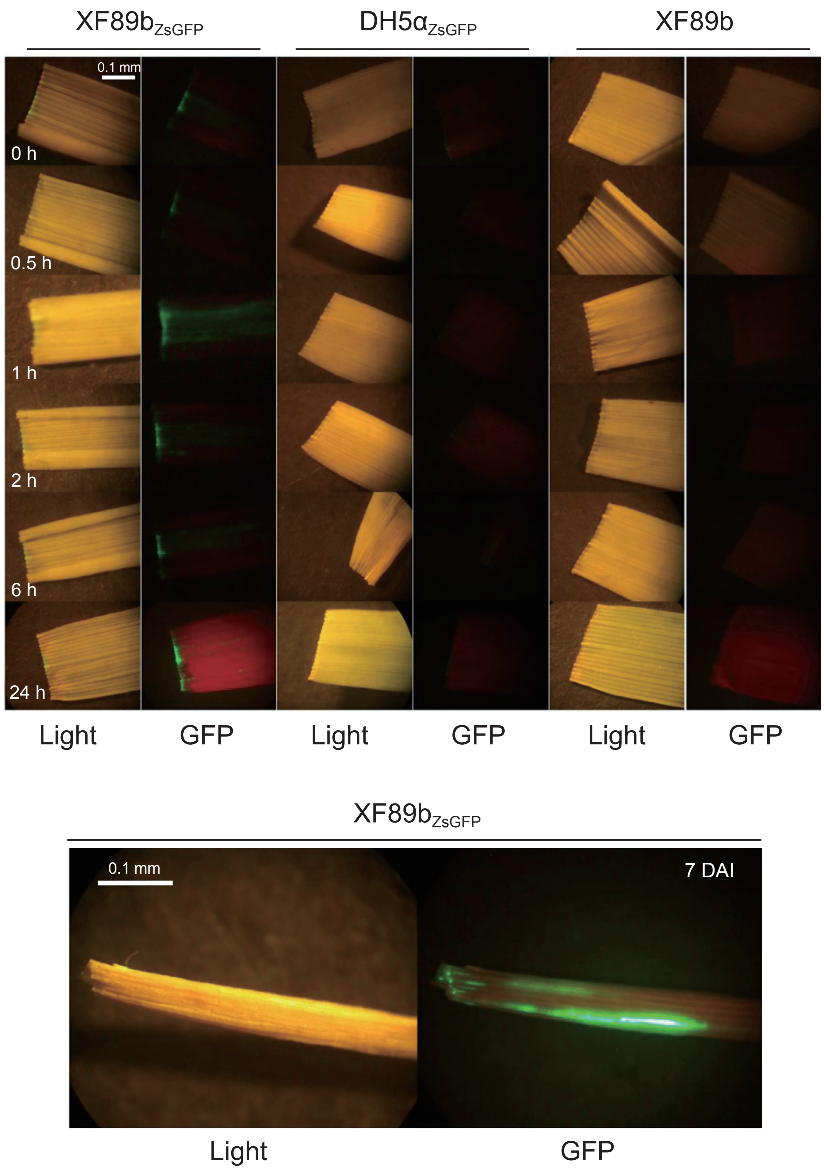

圖 5. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 及 *Escherichia coli* 在水稻白化苗中表現綠螢光蛋白質之觀察。

Fig. 5. Visualization of *X. oryzae* pv. *oryzae* and *E. coli* expressing GFP in the dark-treated albino rice seedlings. GFP: jellyfish green fluorescent protein.

呈現螢光訊號，但在 7 DAI 時，則與 XF89b$_{ZsGFP}$ 的接種葉一樣，即可觀察到接種葉已形成病斑。

上述結果顯示，在沒有葉綠素螢光干擾的情況下，XF89b$_{ZsGFP}$ 接種在 0.5 h，即可觀察到螢光重組菌株的表現與入侵。因此，後續若在利用此重組菌株，感染最高分櫱期的水稻植株時，螢光顯微鏡可能需要進行下列的改良：(1) 可增加螢光激發光源的強度，由現行 50 W 增加到 100 W；(2) 可選擇較窄波長範圍的濾鏡，建議由現行的 505–530 nm 改為 520 nm，並增加一 510 nm 的分色鏡。Han *et al*. (2008)

即應用具有上述改良條件的 Zeiss Axiophot 螢光顯微鏡 (Zeiss, Germany)，成功觀測到綠螢光基因標定 *X. oryzae* pv. *oryzae* POX099$_{GFP}$ 在水稻病葉上表現螢光，但因所用綠螢光基因 (*GFP*) 較弱，需在 12 DAI 方能觀察到水稻病葉的螢光表現。

雖然，本研究最後改用白化苗，作為接種宿主，觀測 XF89b$_{ZsGFP}$ 的感染過程。其植株的生理應與現行慣用高分櫱期植株不同。因此，XF89b$_{ZSGFP}$ 在白化苗感染的過程，可能與在最高分櫱期植株有所不同。然而，此系統在接種初期，即能觀察到 XF89b$_{ZsGFP}$ 在病葉的繁殖與入侵，是目前最早能觀測到白葉枯病菌感染水稻植株的報告。另一方面，本研究標定 *X. oryzae* pv. *oryzae* XF89b 所用的螢光基因，是兔海葵 *ZsGFP* 基因，其螢光強度是 EGFP 的 2.5 倍，而 EGFP 的亮度又是正常 GFP 的 35 倍 (Li *et al*. 1997; Matz *et al*. 1999)。因此，XF89b$_{ZsGFP}$ 應較上述 Han *et al*. (2008) 所建構的 POX099$_{GFP}$，具有更好的螢光表現，使其在感染宿主時，有更佳的偵測靈敏度。同時，無須破壞性採樣，即可連續在同一病葉觀察病勢的發展。

結論

兔海葵綠螢光蛋白質 (ZsGFP) 是一新型的報導標誌蛋白質，且較原來的 GFP 有更強的綠螢光表現。因此，本研究利用 *ZsGFP* 基因，構築在 *Xanthomonas* 細胞中可持續表現的重組質體 pRBBZsGFP，並轉型至台灣本土收集的白葉枯病菌株 (XF89b)，獲得可以持續表現綠螢光的重組菌株 XF89b$_{ZsGFP}$。接種於「台農 67 號」白化苗，在感染 0.5–1 h，即可發現 XF89b$_{ZsGFP}$ 的繁殖與入侵。但隨後水稻宿主啟動免疫防禦系統，壓抑入侵 XF89b$_{ZsGFP}$ 的繁殖，使螢光的表現轉弱。但在 7 DAI 時，綠螢光的表現轉強並持續向病葉基部發展，顯示 XF89b$_{ZsGFP}$ 可能突破水稻的防禦機制，並繼續沿著維管束繁殖向葉片基部蔓延感染。這是目前最早能觀測到白葉枯病菌感染水稻植株的研究結果。同時，此系統無須破壞性取樣，即可持續且即時地觀察同一病葉的病勢發展。因此，本研究所建構之 XF89b$_{ZsGFP}$，確實可作為即時檢測方法，觀察接種後的病菌感染能力及感染過程，亦能作為未來探討白葉枯病菌與水稻宿主間交互作用的試驗平台。

引用文獻

Bracha-Drori, K., K. Shichrur, A. Katz, M. Oliva, R. Angelovici, S. Yalovsky, and N. Ohad. 2004. Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. Plant J. 40:419–427.

Caplan, J. L., P. Mamillapalli, T. M. Burch-Smith, K. Czymmek, and S. P. Dinesh-Kumar. 2008. Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. Cell 132:449–462.

Chen, F., Y. Yuan, Q. Li, and Z. He. 2007. Proteomic analysis of rice plasma membrane reveals proteins involved in early defense response to bacterial blight. Proteomics 7:1529–1539.

Chun, W., G. S. Waldo, and G. V. Johnson. 2007. Split GFP complementation assay: A novel approach to quantitatively measure aggregation of tau *in situ*: Effects of GSK3beta activation and caspase 3 cleavage. J. Neurochem. 103:2529–2539.

Cohen, S. N., A. C. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110–2114.

Elibox, W. and P. Umaharan. 2007. A green fluorescent protein-based screening method for identification of resistance in anthurium to systemic infection by *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. Plant Pathol. 56:819–827.

Errampalli, D., K. Leung, M. B. Cassidy, M. Kostrzynska, M. Blears, H. Lee, and J. T. Trevors. 1999. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. J. Microbiol. Meth. 35:187–199.

Fan, J., C. Crooks, and C. Lamb. 2008. High-throughput quantitative luminescence assay of the growth in planta of *Pseudomonas syringae* chromosomally tagged with *Photorhabdus luminescens* luxCDABE. Plant J. 53:393–399.

Gnanamanickam, S. S., V. B. Priyadarisini, N. N. Narayanan, P. Vasudevan, and S. Kavitha. 1999. An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. Curr. Sci. 77:1435–1443.

Han, S. W., C. J. Park, S. W. Lee, and P. C. Ronald. 2008. An efficient method for visualization and growth

of fluorescent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in planta. BMC Microbiol. 8:164.

Hillesheim, L. N. and J. D. Müller. 2005. The dual-color photon counting histogram with non-ideal photodetectors. Biophys. J. 89:3491–3507.

Kado, C. I. and M. G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969–976.

Kauffman, H. E., A. P. K. Reddy, S. P. Y. Hsieh, and S. D. Merca. 1973. An improved technique for evaluation resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis. Rep. 57:537–541.

Keen, N. T., H. Shen, and D. A. Cooksey. 1992. Introduction of cloned DNA into plant pathogenic bacteria. p.45–50. *in*: Molecular Plant Pathology: A Practical Approach. (Gurr, S. J., M. J. McPherson, and D. J. Bowles, eds.) IRL. Oxford. 328 pp.

Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, and K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166:175–176.

Li, X., G. Zhang, N. Ngo, X. Zhao, S. R. Kain, and C. C. Huang. 1997. Deletions of the Aequorea victoria green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. J. Biol. Chem. 272:28545–28549.

Mahmood, T., A. Jan, M. Kakishima, and S. Komatsu. 2006. Proteomic analysis of bacterial-blight defense-responsive proteins in rice leaf blades. Proteomics 6:6053–6065.

Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, and S. A. Lukyanov. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. Nature Biotechnol. 17:969–973.

Mizukami, T. and S. Wakimoto. 1969. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. Annu. Rev. Phytopathol. 7:51–72.

Mizuno, H., A. Sawano, P. Eli, H. Hama, and A. Miyawaki. 2001. Red fluorescent protein from Discosoma as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. Biochemistry 40:2502–2510.

Newman, K. L., R. P. Almeida, A. H. Purcell, and S. E. Lindow. 2003. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. Appl. Environ. Microbiol. 69:7319–7327.

Niño-Liu, D. O., P. C. Ronald, and A. J. Bogdanove. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. Mol. Plant Pathol. 7:303–324.

Shimomura, O., F. H. Johnson, and Y. Saiga. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. J. Cell. Comp. Physiol. 59:223–239.

Soby, S. D. and M. J. Daniels. 1996. Catabolite-repressor-like protein regulates the expression of a gene under the control of the *Escherichia coli lac* promoter in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46:559–561.

Stewart, C. N. 2001. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. Plant cell Rep. 20:376–382.

Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. Ann. Rev. Biochem. 67:509–544.

Yoshimura, S. and K. Tahara. 1961. Morphological studies on the *Xanthomonas oryzae* under electron microscopy. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 26:61.

Yu, Q. H., S. M. Dong, W. Y. Zhu, and Q. Yang. 2007. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus* in the gastro-intestinal tract of chicken. FEMS Microbiol. Lett. 275:207–213.

Zipfel, C., S. Robatzek, L. Navarro, E. J. Oakeley, J. D. Jones, G. Felix, and T. Boller. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. Nature 428:764–767.

Development of an Efficient Fluorescent Visualization Method for the Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Infection in Rice Plants

Da-Gin Lin[1,*], Yu-Ling Lin[2], Chun-Wei Chen[3], Hui-Chen Lai[2], Yi-Wen Wang[4], Szu-Yi Chou[5], and Chang-Sheng Wang[6,*]

Abstract

Lin, D. G., Y. L. Lin, C. W. Chen, H. C. Lai, Y. W. Wang, S. Y. Chou, and C. S. Wang. 2015. Development of an efficient fluorescent visualization method for the detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection in rice plants. J. Taiwan Agric. Res. 64(1):10–20.

Detection of pathogen infection is an important step in pathogen-host interaction study. A *Xanthomonas* fluorescent expression plasmid, pRBBZsGFP, was constructed with a strong fluorescent gene *ZsGFP* and the pBBR1MCS vector for immediate detection of bacterial blight pathogen infection. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH5α and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b, respectively. The transformants, DH5α_{ZsGFP} and XF89b_{ZsGFP}, were confirmed by PCR genotype analysis and the observation of continuously expression of green fluorescent proteins. After infection of 'TNG67' at the maximum tillering stage by XF89b_{ZsGFP}, the observation of ZsGFP was interfered with the fluorescence of chlorophyll. The results showed that the bacterial multiplication of XF89b_{ZsGFP} only could be observed at the incision site at 3 DAI (days after inoculation) and XF89b_{ZsGFP} colonized from the cutting site to leaf base at 7 DAI. Using dark-treated albino rice seedlings, the interference of chlorophyll fluorescence could be reduced and the multiplication and colonization of XF89b_{ZsGFP} could be detected in 0.5 h after inoculation and the maximum fluorescence was observed on the same leaf in 1 h after inoculation. However, the fluorescence was reduced in the following time course indicating that the multiplication and colonization of XF89b_{ZsGFP} might be suppressed by the endogenous immune system of rice. At 7 DAI, the stronger fluorescence was observed again on the same leaf and extended continuously to the leaf base, suggesting that the rice immune system was broken down by the XF89b_{ZsGFP}. To our knowledge, this is the first report on the observation of *X. oryzae* pv. *oryzae* in rice plants. Importantly, this is a non-destructive system for pathogen detection and the multiplication and colonization of pathogen can be directly observed on the inoculated leaf. Therefore, the XF89b_{ZsGFP} and system established in this study can be served as a platform for real-time observation of virulence and pathogenicity of *X. oryzae*, and can also be applied to the study of the interaction between pathogen and host.

Key words: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *ZsGFP* gene, *Xanthomonas* fluorescent expression system, Investigation of disease progress, Pathogen-host interaction.

Received: August 4, 2014; Accepted: October 14, 2014.

[*] Corresponding authors, e-mail: dagin@tari.gov.tw and wangchansen@nchu.edu.tw
[1] Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistants, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Assistant Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[6] Associate Professor and Head, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(1):21–31 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06401.03 研究報告

由 *Phomopsis mangiferae* 引起之檬果採收後病害發生調查及防治藥劑篩選

黃巧雯 [1] 楊宏仁 [2] 林靜宜 [1] 許淑麗 [3] 賴素玉 [3] 柯文琪 [3] 倪蕙芳 [4,*]

摘要

黃巧雯、楊宏仁、林靜宜、許淑麗、賴素玉、柯文琪、倪蕙芳。2015。由 *Phomopsis mangiferae* 引起之檬果採收後病害發生調查及防治藥劑篩選。台灣農業研究 64(1):21–31。

Phomopsis mangiferae 係引起台灣檬果果實果腐病及蒂腐病病原菌之一，本研究針對該病原菌進行其在田間引起病害之發生率調查及其防治藥劑篩選評估。由 2009–2011 年間在台南市玉井及官田地區之愛文檬果果實採後病害調查資料顯示，官田地區檬果果實發生採後果腐或蒂腐病之平均罹病率有 51.5%，皆由 *P. mangiferae* 所引起，明顯高於玉井地區之 11.9%。由此得知，官田地區的果腐病或蒂腐病之主要病原菌為 *P. mangiferae*。續將 3 株 *P. mangiferae* 分離株之分生孢子無傷口接種於田間檬果樹上之未成熟果實，結果顯示大部分果實均可於果實採收後於接種部位出現果腐病斑，顯示本菌於無傷口接種時亦具有感染能力。測試賽普護汰寧、貝芬依滅列、依普同、腐絕、貝芬菲克利、免得爛、甲基多保淨、亞托待克利、亞托敏及得克利等 10 種藥劑對 *P. mangiferae* 之菌絲生長及孢子發芽影響，結果顯示得克利、亞托待克利及貝芬菲克利在 10–100 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度下，對所測試之 3 株 *P. mangiferae* 菌株具有 97% 以上之菌絲生長抑制率；而賽普護汰寧、亞托敏及亞托待克利處理下，則可顯著降低病原菌之分生孢子發芽率。以上藥劑皆為目前檬果炭疽病之推薦防治藥劑，於田間防治時可參考作為防治由 *P. mangiferae* 引起之採收後病害之用。

關鍵詞：白檬果、採收後病害、*Phomopsis mangiferae*、藥劑篩選。

前言

檬果 (*Mangifera indica* L.) 為台灣重要經濟果樹之一，根據 2012 年行政院農業委員會農業統計年報資料 (http://www.afa.gov.tw/Public/Grain-Statistics/20131029151177055.pdf) 顯示，檬果栽培面積約有 16,356 ha，年產量為 167,247 Mg，主要栽培產地依序為台南市、屏東縣及高雄市等。常見的栽培品種有在來種 (土檬果)、愛文、金煌、凱特及海頓等。

檬果果實採收後病害主要有 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. 引起之炭疽病及葡萄座腔菌科 (Botryosphaeriaceae) 真菌與擬莖點霉屬之 *Phomopsis mangiferae* S. Ahmad 等病原所引起的果實腐爛包括蒂腐，此類病害多具潛伏性，常於採收黃熟後方出現病徵，進而降低櫥架壽命並影響外銷果實品質 (Ann & Yang 2003; Ko *et al*. 2009; Iram *et al*. 2013)。葡萄座腔菌科 (Botryosphaeriaceae) 真菌已知廣泛存在世界各地，可造成許多植物潰瘍、枝枯、葉斑、果腐等病徵 (Slippers & Wingfield 2007; de Macedo & Barreto 2008; Yu *et al*. 2009; Ni *et al*. 2012; Úrbez-Torres *et al*. 2013)。Ni *et al*. (2012) 近年來釐清在台灣引起檬果嚴重果腐病之主要

投稿日期：2014 年 9 月 15 日；接受日期：2014 年 11 月 24 日。
* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所研究員兼分所長。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系研究助理。台灣 嘉義市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

病原，包括 *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.、*Neofusicoccum mangiferae* (Syd. & P. Syd.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips、*Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips、*Fusicoccum aesculi* Corda 等，此四種均屬於葡萄座腔菌科。而本研究中所探討的 *Phomopsis* 屬則為腔胞菌綱 (Coelomyctes) 真菌中的一個大屬，其有性世代歸為子囊菌 (Ascomycotina) 的 *Diaporthe* 屬，目前的種名約超過 1,000 種，為寄主種類繁多之重要植物病原真菌 (Rossman *et al*. 2007; Gomes *et al*. 2013)。根據美國植物病理學會病害名彙 (https://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/default.aspx) 紀錄，*Phomopsis* 屬在多種果樹上造成的果實病害有由 *Phomopsis perseae* Zerova 引起的酪梨果腐病、由 *Phomopsis* sp. 引起的木瓜果腐病、由 *Phomopsis mangiferae* S. Ahmad 引起的檬果蒂腐病 (Ploetz *et al*. 1994)、由 *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc. 引起的葡萄果腐病 (Pearson & Goheen 1988)、由 *Phomopsis mali* Roberts 引起的桃或蘋果果腐病 (Rosenberger & Burr 1982) 等，而台灣植物病害名彙 (Hsu *et al*. 2002) 所記錄則有由 *Phomopsis citri* Fawc. 引起的柑橘黑點病或褐色蒂腐病、*Phomopsis fukushii* Tanaka *et* Endo 引起的梨枝枯病及蘋果褐腐病、*P. mali* Roberts 引起的梨蒂腐病及蘋果果腐病、*Phomopsis vitimegasora* Kuo and Leu 引起的葡萄枝枯病及由 *Phomopsis* sp. 引起的柑橘流膠病或番石榴果腐病。其中，已知 *P. mangiferae* 在澳大利亞、巴西、中國、古巴、印度、馬來西亞、美國及台灣等各國檬果產地，為引起檬果果實發生嚴重果腐之病原 (Ploetz *et al*. 1994; Ko *et al*. 2009; de Oliveira Costa *et al*. 2010; Ni *et al*. 2012; Trakunyingcharoen *et al*. 2014)。

在檬果採後病害調查中，果腐病常與炭疽病同時出現在果身上，且病徵易被無經驗者混淆，彼此間病徵差異在於炭疽病病斑顏色為炭黑色、凹陷、病斑保持乾硬且病勢進展較慢並常顯現淚斑狀，炭疽病菌侵入果肉較淺約 10–20 mm 深度，當環境潮濕時則在病斑上產生橘紅色孢子堆；而由 Botryosphaeriaceae 科引起果腐病之病徵為果皮呈現水浸狀、病斑顏色較黑、周緣常呈不規則狀，病斑可延伸至果肉內，造成果肉腐爛；此外，由 *P. mangiferae* 引起果腐病之病斑顏色較淺、周緣圓形且較平滑，病斑進展較緩慢，仍亦使果皮呈現水浸狀，造成果肉腐爛而失去商品價值 (Ploetz *et al*. 1994; Cooke *et al*. 2009; Ni *et al*. 2012)。

有關檬果採後病害防治上，炭疽病主要防治方式有注意田間衛生、於開花期至果實套袋前進行化學防治、套袋及採後溫水處理或蒸熱處理等 (Ann *et al*. 1998; Chan 2009; Kumah *et al*. 2011)。其中，在田間化學防治上，目前植物保護手冊推薦於檬果炭疽病之防治藥劑已有 33 種 (Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture n.d.) 供農友交替使用。而由 Botryosphaeriaceae 科真菌所引起的檬果果腐病之防治藥劑中，其貝芬替 (Carbendazim) 可有效控制由 *L. theobromae* 引起之檬果果腐病發生 (Bhatt & Jadeja 2010)；而 Ni (2012) 於田間進行檬果果腐病防治效果評估試驗，亦指出亞托敏 (Azoxystrobin) 施用可有效地降低由 Botryosphaeriaceae 科真菌所引起的檬果果腐病之發生。

雖然過去已有 *P. mangiferae* 引起檬果採收後病害之記載，然而在台灣從未針對此病害進行田間及果實採收後發生率相關調查，且亦無有效防治方法可供農友使用。因此，在炭疽病控制良好的檬果園，仍有此類病原菌反而成為危害果實之主要病因。為此，本研究在台灣台南市玉井及官田地區分別進行由 *P. mangiferae* 引起採後病害發生調查，來瞭解此病害在台灣檬果產區之發病嚴重程度，並進行防治藥劑篩選評估，以作為未來相關病害防治之參考。

材料方法

P. mangiferae 引起之檬果採收後病害調查及病原分離

2009–2011 年連續 3 年於台南市玉井及官田地區共 45 個愛文檬果園進行果實採集，每

個果園隨機摘取 20 顆套袋約 8 分熟之硬熟果實，於實驗室內拆除套袋逐一標示。以電石催熟 2 d 後，逐一置於小塑膠籃內以避免果實互相汙染，再以大型塑膠袋保濕 2 d 後，置於室溫中，並於催熟後 7 d 調查果實病害之發生情形。果實病害發生率之計算公式如下：罹病率 (disease incidence, %) ＝ (產生果腐病斑或蒂腐病斑果實數/全部調查果實數) × 100%。

此外，並選取具有果腐病或蒂腐病之果實進行組織分離，罹病果表皮以 75% 酒精直接擦拭表面，待表面酒精揮發後，以滅菌解剖刀切取病斑內病健部交接處大小約 2–3 mm^2 組織，置於以乳酸 (lactic acid) 酸化 PDA (acidified PDA) 平板上 (pH 3.8)。其配製方法為將 50% (v/v) 乳酸溶液 750 μL，加入經滅菌後降溫到 55℃之 300 mL PDA (potato dextrose agar, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 中輕晃混勻。置於室溫下培養約 7 d 後，挑取如 Punithalingam (1993) 所述，具典型 *Phomopsis* 特徵，即生長緩慢且為灰白色至淡褐色之綿密狀菌落，將菌落邊緣之菌絲尖端移至 PDA 平板上，待產孢後，將其孢子塗佈於 2% 水瓊脂 (water agar; WA) 平板上進行單孢分離。所得之分離株依據 Punithalingam (1993) 與 Ko *et al*. (2009) 之形態學鑑定為 *P. mangiferae*，並將分離株培養於 PDA 斜面，並置於 8–10℃冰箱中保存。另外，由 *P. mangiferae* 在田間造成檬果果實病害之發生率之計算公式如下：發生率 (occurrence frequency, %) ＝ (由果腐病斑或蒂腐病斑分離出 *P. mangiferae* 之果實數/果實發生果腐病或蒂腐病之總數) × 100%。

接種源配製

從保存管中將分離菌株菌絲塊移植 PDA 平板上進行活化，於 25℃無光照之恆溫箱中培養約 4–5 d 後，切取菌絲尖端，繼而移植至 PDA 平板上培養 1–2 wk。待其產孢後，以無菌水洗下培養皿內所產生之分生孢子，並利用血球計數器 (hemacytometer, Bright-Line, USA) 測定孢子濃度，再以無菌水調製濃度為 200 conidia μL^{-1} 之孢子懸浮液供試驗果實接種用。本研究所用 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 菌株為來自台南市官田地區愛文品種之罹病果所分離的 *P. mangiferae* 菌株。

病原性測定

於農業試驗所嘉義農業試驗分所之愛文檬果園進行植體果實上之接種試驗，以微量滴管吸取 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株之孢子懸浮液各 2 μL (約 100 個孢子)，滴在尚未成熟之青綠色中果期果實後，隨即在其上覆蓋 20 μL 尚未凝固之 1.5% 水瓊脂培養基 (water agar; WA) 以便將孢子懸浮液固定於果實上，再以透氣膠帶將 WA 固定於果實表面。接種後之果實隨即進行套袋，以避免後續自然狀態下其他病原之感染，每一株菌株接種 15 顆果實，每個果實僅做一個接種點，對照組則以無菌水進行接種。接種後 6 wk，將果實採收以電石催熟後，置於室溫 2 wk 後進行觀察及記錄接種點果腐病發生情形，本試驗重複進行 2 次。

藥劑對 *P. mangiferae* 菌絲生長之影響

將供試菌株 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 移植至 PDA 平板上，於室溫培養 3 d 後，以滅菌過孔徑 0.5 cm 之打孔器切取菌絲塊供試，並利用藥劑平板測試法測定供試藥劑之抑菌效果。所使用 10 種藥劑及種類如下：62.5% 賽普護汰寧水分散性粒劑 (cyprodinil + fludioxonil，先正達股份有限公司)、40% 貝芬依滅列可濕性粉劑 (carbendazim + imazalil，正農化學股份有限公司)、23.7% 依普同水懸劑 (iprodione，雅飛有限公司)、40% 腐絕可濕性粉劑 (thiabendazole，富農化學工業股份有限公司)、34.5% 貝芬菲克利可濕性粉劑 (carbendazim + hexaconazole，台益有限公司)、80% 免得爛水分散性粒劑 (metiram，巴斯夫股份有限公司)、70% 甲基多保淨可濕性粉劑 (thiophanate methyl，好速股份有限公司)、32.5% 亞托待克利水懸劑 (azoxystrobin + difenoconazole，先正達股份有限公司)、23% 亞托敏水懸劑 (azoxystrobin，先正達股份有限公司)、及 26% 得克利水基乳劑 (tebuconazole，拜耳股份有限公司)，配製成含有效成分濃度為 1 mg a.i. L^{-1}、10 mg a.i. L^{-1}、100 mg a.i. L^{-1} 之 PDA 培養基，另以不添加藥劑之 PDA 平

板作為對照。將上述直徑 0.5 cm 的菌絲塊，菌絲面朝下置入直徑 8.5 cm 之含藥的 PDA 培養基平板中央，置於 25℃之定溫箱中黑暗培養，於培養後第 14 d 測量其菌絲生長直徑，每處理 6 重複，本試驗重複進行 3 次。試驗結果按下列公式換算藥劑對菌絲之生長抑制率 : 抑制率 (%) = [(對照組平均生長直徑 − 藥劑處理組平均生長直徑)/對照組平均生長直徑] × 100%。

藥劑對 *P. mangiferae* 分生孢子發芽之影響

以無菌微量吸管吸取 50 μL 上述不同藥劑之溶液，置於 3 凹載玻片之凹槽內，再以無菌微量吸管吸取 1 μL 供試之 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 孢子懸浮液 (200 conidia μL^{-1})，滴於上述含農藥之載玻片凹槽內，並混合均勻，使凹槽內混合液之有效成分濃度為 10 mg a.i. L^{-1}。供試載玻片置於加有 5–10 mL 無菌水之 8.5 cm 塑膠培養皿中，以避免玻片水分蒸散，並將培養皿置於 25℃之定溫箱中，經 24 h 後於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率。每個處理 2 皿，共 6 重複，本試驗重複進行 3 次。以滅菌蒸餾水處理做為對照組。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗在 5% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

P. mangiferae 引起之檬果採收後病害調查

本研究於 2009–2011 年由台南市玉井及官田地區共採樣 45 個愛文檬果園進行果腐病及蒂腐病病害調查，其中玉井地區共調查 22 個果園 (149 顆果實)、官田地區共調查 23 個果園 (282 顆果實)。果實總數 431 顆，其中有 162 顆果實 (玉井地區有 55 顆、官田地區有 107 顆) 於蒂頭部位出現腐爛病徵，亦有 342 顆果實 (玉井地區有 105 顆、官田地區有 237 顆) 於果身出現腐爛病徵，其調查結果如表 1 所示。連續 3 年玉井地區果園內果實果腐病或蒂腐病罹病率依序為 50.0、27.5 及 31.8%，3 年平均罹病率為 36.4%；而官田地區果園內果實果腐病或蒂腐病罹病率依序為 63.0、75.6 及 73.2%，3 年平均罹病率為 70.6%。

進一步將罹病果實進行組織分離，分析由 *P. mangiferae* 所引起之果實病害發生率，如表 1 所示。玉井地區果園內罹病果實由 *P. mangiferae* 引起之病害發生率依序為 30.5、29.0 及 38.8%，3 年平均發生率為 32.8%；而官田地區則依序為 74.8、76.3 及 67.6% 之 *P. mangiferae* 發生率，3 年平均發生率為 72.9%。結

表 1. 2009–2011 年在台南市玉井區及官田區檬果蒂腐病或果腐病之罹病率及 *Phomopsis mangiferae* 病原之發生率。

Table 1. The incidence of stem-end rot or fruit rot disease and occurrence frequency of *P. mangiferae* on mango fruits diseases in Yujing and Guntain area during 2009–2011.

Location	Year	Disease incidence (%)[z]	Occurrence frequency of *P. mangiferae* (%)[y]
Yujing	2009	50.0	30.5
	2010	27.5	29.0
	2011	31.8	38.8
Guntain	2009	63.0	74.8
	2010	75.6	76.3
	2011	73.2	67.6

[z] Incidence of mango stem-end rot or fruit rot in each area was evaluated by the following formula: Disease incidence (%) = (Number of fruits which showed symptoms of stem-end rot and fruit rot/Total number of fruits) × 100%.

[y] Occurrence frequency of *P. mangiferae* (%) = (Number of fruits colonized by *P. mangiferae*/Total number of fruits with stem-end rot and fruit rot symptoms) × 100%.

果得知，官田地區由 *P. mangiferae* 引起檬果果實之果腐病或蒂腐病發生率明顯高於玉井地區。此外，病徵觀察中亦得知 *P. mangiferae* 可引起兩種類型病徵表現，其中一型病徵可直接由果身開始進展者之果腐病 (圖 1A)，另一型病徵是由果蒂向果身進展之蒂腐病 (圖 1B)，其病斑均為淺褐色至褐色圓斑、病斑周緣圓滑、按壓果皮易破裂流汁、無炭疽病之淚斑狀現象。

病原性測定

接種結果確認 *P. mangiferae* 於檬果果實上病原性，並作為未來進一步藥劑試驗之供試菌株。將 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株之分生孢子分別接種於田間未成熟之中果時期檬果果實，結果如表 2 所示。在第 1 次試驗於田間接種 Ph-453 分離株孢子懸浮液之 15 顆檬果果實中，有 9 顆果實在接種點產生果腐病班，而在接種 Ph-546 及 Ph-550 分離株孢子懸浮液之各 15 顆檬果果實中，因有些自然落果，故採回實驗室的果實分別為 14 顆與 13 顆，然其中仍各自有 11 顆果實於接種點產生果腐病斑，3 株菌株也經第 2 次試驗再次確認病原性，而對照組之檬果果實則未表現病徵 (表 2、圖 1C、1D)。將接種點產生之果腐病斑再次進行組織分離，完成科霍氏準則 (Koch's postulates) 證實 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 三菌株對檬果具有病原性。

藥劑對 *P. mangiferae* 病原菌菌絲生長之影響

將供試藥劑添加於 PDA 平板上，測試各藥劑對 *P. mangiferae* 病原菌菌絲生長之抑制情形，結果如表 3 所示。賽普護汰寧於 1 mg a.i. L^{-1} 有效成分藥劑濃度下，對 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株之菌絲生長抑制率分別為 95.1、97.0 及 93.0%， 而 1 mg a.i. L^{-1} 有效成分藥劑濃度之得克利對 3 株菌株之菌絲生長抑制率則為 90.7、94.3 及 87.9%。若於 10 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度下，得克利對上述 3 株菌株之菌絲生長抑制率皆為 100%。而亞托待克利對 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 菌絲生長之抑制率分別為 100、100 及 98.4%，甲基多保淨對 Ph-543 之菌絲抑制率為 6.8%，但對 Ph-546 及 Ph-550 菌絲生長抑制率則僅有 10.1% 及 9.2% 的抑制率；免得爛則對 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 菌絲生長抑制率則分別僅有 19.0、27.5 及 7.4%。若有效成分濃度提高至 100 mg a.i. L^{-1} 下，則貝芬依滅列、貝芬菲克利、亞托待克利及得克利對 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 菌絲皆達到 100% 的

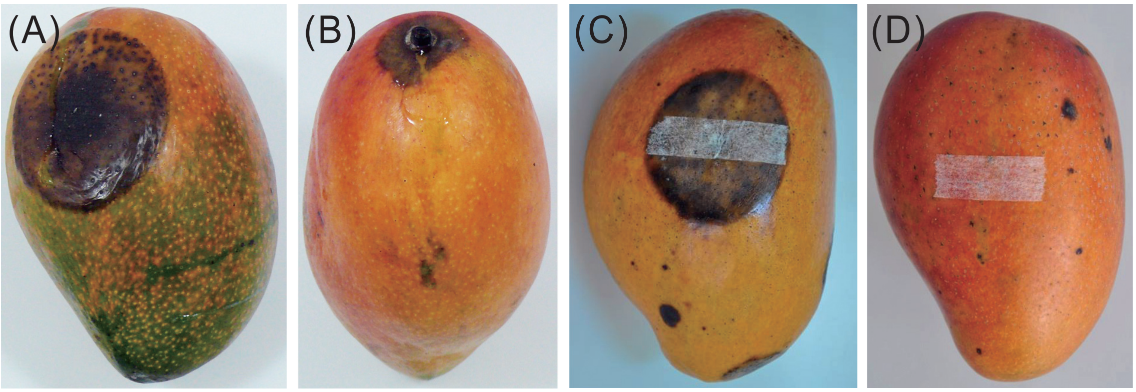

圖 1. 由 *Phomopsis mangiferae* 引起檬果採後病害之病徵。(A) 由果身開始進展者之果腐病；(B) 由果蒂進展之蒂腐病；(C) 愛文檬果果實無傷口接種 *P. mangiferae* Ph-550 分離株之分生孢子後之果腐病病徵；(D) 以水作為對照組。

Fig. 1. Post-harvest diseases of mango fruit showing symptoms of fruit rot (A) and stem-end rot (B) caused by *P. mangiferae*. Symptoms of mango fruit rot by *P. mangiferae* Ph-550 (C) isolate following inoculation on non-wounded fruit in the field. (D) Inoculation with sterile water as control.

表 **2.** 測定不同 *Phomopsis mangiferae* 分離株之病原性及致病力。

Table 2. Pathogenicity test on differential isolates *P. mangiferae* and their virulence.

	No. diseased/No. harvested fruit[y]	
Isolate[z]	Exp. 1	Exp. 2
Ph-453	9/15	12/14
Ph-546	11/14	11/15
Ph-550	11/13	12/14
Control	0/12	0/14

[z] Spores suspension (50 conidia μL^{-1}) of *P. mangiferae* were inoculated on the immature mango fruits in field.
[y] Four to six weeks post inoculation, the fruits were harvested and ripened by calcium carbide treatment. Disease incidence of fruit rot recorded at the14th days mango fruits harvest.

表 **3.** 不同殺菌劑對 *Phomopsis mangiferae* Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株菌絲生長之影響。

Table 3. Effects of different synthetic fungicides on mycelial growth of *P. mangiferae* Ph-453、Ph-546 and Ph-550 isolate.

	Inhibition (%)[z]								
	1 mg a.i. L^{-1}			10 mg a.i. L^{-1}			100 mg a.i. L^{-1}		
Fungicide	Ph-453	Ph-546	Ph-550	Ph-453	Ph-546	Ph-550	Ph-453	Ph-546	Ph-550
62.5% cyprodinil + fludioxonil (WG)	95.1 b[y]	97.0 a	93.0 a	95.7 ab	97.0 a	94.0 b	96.4 b	97.0 a	95.2 b
40% carbendazim + imazalil (WP)	100.0 a	9.2 g	7.3 d	100.0 a	88.1 b	79.4 d	100.0 a	100.0 a	100.0 a
23% azoxystrobin (SC)	32.6 g	44.7 e	26.5 c	39.4 c	41.6 c	26.4 e	50.5 e	48.9 d	36.0 f
23.7% iprodione (SC)	54.3 e	59.2 d	56.1 b	91.9 ab	85.6 b	89.8 c	94.2 c	90.3 bc	93.6 b
40% thiabendazole (WP)	100.0 a	5.9 hi	4.7 d	100.0 a	18.6 e	7.7 f	100.0 a	94.4 ab	86.1 c
34.5% carbendazim + hexaconazole (WP)	100.0 a	41.5 f	31.8 c	100.0 a	100.0 a	97.1 ab	100.0 a	100.0 a	100.0 a
32.5% azoxystrobin + difenoconazole (SC)	78.5 d	88.7 c	54.0 b	100.0 a	100.0 a	98.4 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
26% tebuconazole (SC)	90.7 c	94.3 b	87.9 c	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
80% metiram (WG)	5.1 h	7.3 gh	5.3 d	19.0 d	27.5 d	7.4 f	84.8 d	88.4 c	73.2 d
70% thiophanate methyl (WP)	49.1 f	4.4 i	5.8 d	86.8 b	10.1 f	9.2 f	100.0 a	51.5 d	55.6 e
LSD (P = 0.05)	2.9	2.6	6.1	9.6	5.8	3.6	1.3	5.7	3.6

[z] Inhibition (%) = [(Diameter of mycelial growth on PDA without fungicide - diameter of mycelial growth on PDA with fungicides)/ diameter of mycelial growth on PDA without fungicide] × 100%.
[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

菌絲生長抑制率。而亞托敏即使在 100 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度下，對 3 株菌株菌絲生長亦僅達 50.5、48.9 及 36.0% 之生長抑制率。

藥劑對 *P. mangiferae* 病原菌分生孢子發芽之影響

測試藥劑對 *P. mangiferae* 病原菌分生孢子發芽之影響，結果如表 4 所示。Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株於 1 mg a.i. L^{-1} 有效成份藥劑濃度下，亞托敏及亞托待克利處理其分生孢子之發芽率皆為 2.0% 以下，對於孢子發芽具有極佳的抑制性。當有效成份濃度提高至 10 mg a.i. L^{-1} 下，賽普護汰寧、亞托敏、亞托待克利等 3 種藥劑處理下，其 3 株病原菌之分生孢子之發芽率皆為 2% 以下。而在 10 mg a.i. L^{-1}

表 **4.** 不同殺菌劑對 *Phomopsis mangiferae* Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株孢子發芽之影響。

Table 4. Effects of fungicides on conidial germination of *P. mangiferae* Ph-453、Ph-546 and Ph-550 isolate.

Fungicide	Spore germination (%)[z]					
	1 mg a.i. L^{-1}			10 mg a.i. L^{-1}		
	Ph-453	Ph-546	Ph-550	Ph-453	Ph546	Ph-550
62.5% cyprodinil + fludioxonil (WG)	34.3 d[y]	38.7 e	39.3 f	0.0 b	1.3 e	0.0 e
40% carbendazim + imazalil (WP)	0.0 e	46.7 de	65.8 e	0.0 b	16.7 bc	15.0 d
23% azoxystrobin (SC)	0.0 e	2.0 f	0.0 g	0.0 b	0.0 e	0.0 e
23.7% iprodione (SC)	91.5 a	62.5 b	88.8 a	47.7 a	37.2 a	53.7 b
40% thiabendazole (WP)	0.0 e	51.8 cd	78.8 cd	0.0 b	14.5 bcd	52.2 b
34.5% carbendazim + hexaconazole (WP)	0.0 e	44.8 de	73.7 d	0.0 b	9.7 d	32.5 c
32.5% azoxystrobin + difenoconazole (SC)	0.0 e	0.0 f	0.0 g	0.0 b	0.0 e	0.0 e
26% tebuconazole (SC)	53.3 c	59.0 bc	83.2 bc	0.0 b	11.2 cd	0.0 e
80% metiram (WG)	76.7 b	79.2 a	85.3 ab	0.0 b	10.2 d	0.0 e
70% thiophanate methyl (WP)	39.8 d	62.0 b	80.2 bc	0.0 b	16.8 b	74.2 a
LSD (P = 0.05)	8.3	8.2	5.3	2.6	5.6	5.9

[z] Spore germination (%) = (No. of spore germinate on water with fungicide/No. of spore germinate on water without fungicide) × 100%.

[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

有效濃度的腐絕處理下，則僅能完全抑制 Ph-453 菌株之分生孢子發芽，Ph-546 及 Ph-550 則仍分別有 14.5% 及 52.2 % 的發芽率。另外 10 mg a.i. L^{-1} 有效濃度的甲基多保淨處理下，亦完全抑制 Ph-453 菌株之分生孢子發芽，但對 Ph-546 及 Ph-550 則仍分別有 16.8% 及 74.2% 的發芽率。而在 10 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度之依普同作用下，Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株之分生孢子發芽率分別為 47.7、37.2 及 53.7%。

討論

檬果果實的病害如炭疽病、果腐病及蒂腐病均為潛伏病害，於果實黃熟後表現病徵 (Ann & Yang 2003; Ni *et al*. 2012; Iram *et al*. 2013)。本文所探討由 *P. mangiferae* 引起之檬果果實病害亦為其中之一種，潛伏病害若未於田間進行適當防治，將於採收後造成嚴重的損失。為此，本研究就 *P. mangiferae* 在台灣檬果產區之發生情形進行調查，結果顯示台南市官田區之檬果果腐病 (包含蒂腐病) 有平均高達 51.5% 為由 *P. mangiferae* 所引起，遠高於玉井地區之 11.9%。根據 Ni *et al*. (2012) 在屏東枋山、台南玉井及官田地區檬果果腐病害結果顯示，枋山、玉井及官田地區檬果果腐病果實由 Botryosphaeriaceae 科真菌內之 *L. theobromae*、*N. mangiferae*、*N. parvum* 或 *F. aesculi* 引起之比例分別為 60.1、74.9 及 25.1%，顯然枋山及玉井地區之檬果果腐病主要由 Botryosphaeriaceae 科真菌所引起，而官田地區由 Botryosphaeriaceae 科真菌引起之果腐病比率則相對明顯為低。此結果佐證本研究資料，可推論官田地區的果腐病害主因為 *P. mangiferae*。玉井及官田地區造成檬果果實腐爛病原菌相有如此大的差異性，是否與農友管理栽培方式、接穗來源或當地氣候因子及地形等因素有關，則仍有待進一步深入探討。但是研究顯示不同區域果園之病原菌相確實存在顯著差異性，此類此類病原菌又具潛伏感染之特性，未來進行病害防治時，應先確認果實病害之病原種類，方能對症下藥，果園必須因地制宜，方能收事半功倍之效。

擬莖點黴屬 (*Phomopsis*) 為 *Diaporthe* 之無性世代，寄主種類繁多，主要可造成植物莖

及枝條的潰瘍、枝枯、梢枯、果腐、葉斑及葉枯等 (Mostert *et al*. 2001; Thompson *et al*. 2011; Gomes *et al*. 2013; Chen *et al*. 2014)。其中，已知 *P. citri* 引起的柑橘黑點病，以及 *P. viticola* 引起的葡萄枝枯病，其病原菌皆可在枯枝上存活作為感染源 (Pearson & Goheen 1988; Tsai 2003)；另外，*P. fukushii* 引起的梨枝枯病，其病原菌潛伏於枝條內，可於梨枝條上越冬，等春季下雨時，其病原菌的孢子由枝條上形成，作為第一次的感染源，再經由風雨攜帶傳播 (Huang 2005)。因此，清除枯枝應可有效地降低此類病害發生，而由本研究之病原性測定試驗中證實，*P. mangiferae* 病原除了在果蒂造成由蒂頭開始的腐爛斑之外，亦可在檬果果身上造成腐爛病斑。推測此病原之感染途徑除，可能由枝條進入果梗進而在果蒂造成病斑外，田間分生孢子之飛濺可能為造成果身病斑的主要原因。本研究雖未證明田間分生孢子感染源之來源，不過根據 Everett *et al*. (2005) 研究資料中推論，由 *Phomopsis* sp. 引起酪梨果實採收後病害之感染源可能來自於酪梨果園內枯枝、落葉上產生之分生孢子。本研究以田間接種方式，將 *P. mangifearae* 之孢子懸浮液接種於未成熟果實上，結果得知在果實成熟後，其分生孢子接種點確實造成淡褐色腐爛病斑之發生，顯示分生孢子的存在確實可以感染果實造成檬果果腐病斑。因此，若要降低田間此病害之發生，則必須落實清除果園殘枝落葉等田間衛生工作，以有效地減少田間病原菌感染源，進而增進此病害之防治效果。

目前檬果採收後病害之防治，著重於開花至套袋前之化學防治工作，雖然國內目前並無針對 *P. mangiferae* 所擬定之推薦藥劑，因此本研究從現有已推薦在檬果炭疽病防治之 33 種藥劑中，應可初步篩選出對 *P. mangifera* 具有防治潛力之化學藥劑。本研究所測試之 3 株菌株對化學藥劑敏感度具有差異性，如甲基多保淨在 10 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度下，對 Ph-453 菌株之菌絲生長具有 86.8% 之抑制率，同時可完全抑制孢子之發芽。但其對 Ph-546 及 Ph550 則僅有 10.1% 及 9.2% 之菌絲生長抑制率，而且仍分別有 16.8% 及 74.2% 之發芽率；腐絕在 1–100 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度下，對 Ph-453 菌株之菌絲生長皆為 100% 之抑制率，同時亦可完全抑制孢子發芽。但對 Ph-546 及 Ph-550 之菌絲生長抑制效果，則隨著藥劑有效成分濃度提高其抑制效果越佳，而孢子發芽結果亦同。顯然的，造成檬果果實病害之 *P. mangiferae* 病原菌間，其對藥劑之感受性具有差異性，至於是否與病原菌對該藥劑有耐性，抑或是對該藥劑產生抗藥性，未來仍須持續收集更多之菌株對此類藥劑感受性變化進行測試。

本研究藉由生體外測試 10 種藥劑對 3 株 *P. mangiferae* 菌株菌絲生長及孢子發芽之影響，試驗結果顯示，10 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度之得克利、亞托待克利、貝芬菲克利、賽普護汰寧及貝芬依滅列可有效抑制 3 株菌株菌絲生長，而亞托敏、亞托待克利及賽普護汰寧可顯著降低此病原菌之孢子發芽。因 *P. mangiferae* 引起之檬果果實病害屬於採後病害之一，為了有效防治此病害發生，施藥時期及施藥種類尤為重要。根據 Everett *et al*. (1999) 報告指出，酪梨植株於開花時期施用免賴得 (benomyl) 藥劑，可降低由 *Phomopsis* sp. 引起之酪梨蒂腐病發生。

另外，本研究中所測試的亞托敏為普遍用於檬果園炭疽病防治之藥劑，其屬於史托比類 (strobilurins) 藥劑，Strobilurins 類殺菌劑是由野生菇類，如 *Strobilurus tenacellus*、*Mycena galopoda* 或 *Oudemansiella mucida* 等擔子菌所產生的抗生物質 [(E)-β-methoxyacrylic acid] 修改而成 (Kraiczy *et al*. 1996)，其殺菌作用機制為抑制粒線體呼吸作用時 ubiquinone 與 cytochrome *b* 間的電子傳遞，使細胞 ATP 無法順利合成而達到殺菌效果 (Avila-Adame *et al*. 2003)。目前市面上此類藥劑已有克收欣 (kresoxim-methyl)、亞托敏 (azoxystrobin)、三氟敏 (trifloxystrobin)、百克敏 (pyraclostrobin) 及凡殺同 (famoxadone) 等。由本研究發現，10 mg a.i. L^{-1} 有效成分濃度之亞托敏對於 3 株 *P. mangiferae* 分離株的菌絲生長抑制率均不佳，均僅有 50% 以下之抑制率，然而其確可完全抑制 3 株菌株之孢子發芽。根據 Everett *et al*. (2005) 指出，亞托敏在生體外測試對酪梨果

腐病或蒂腐病之 *C. gloeosporioides*、*Botryosphaeria dothidea*、*B. parva* 及 *Phomopsis* sp. 等病原菌其菌絲生長皆抑制效果不佳，但對其孢子發芽抑制效果好，然而實際將亞托敏施用於田間時可有效降低酪梨果腐病或蒂腐病發生；而扶吉胺 (fluazinam) 藥劑雖對上述會引起酪梨果腐病或蒂腐病之病原菌其菌絲生長及孢子發芽皆具有較佳抑制效果，但實際施用於田間其對酪梨果腐病或蒂腐病之防治效果不佳。生體外測試與田間試驗結果有差異性，可能不單純只是藥劑對病原菌菌絲生長或孢子發芽之影響，還牽涉到藥劑施用於植物葉面上或果實表面上之停留時間、藥劑對植物本身滲透移行性、或藥劑對環境因子如 UV 光之耐受性等因素之相互關係。因此，為確定本研究篩選之藥劑對 *P. mangiferae* 引起之檬果果實病害防治效果，未來仍須進一步進行田間防治測試。

綜合上述，由本研究結果顯示，由 *P. mangiferae* 引起採後病害可在檬果果實蒂頭或果身造成腐爛病斑，其感染源可能來自枯枝或落葉上產生之病原菌分生孢子，藉由風雨途徑進行侵染。因此，清除果園枯枝、落葉，可有效地減少田間之感染源密度。而在藥劑防治上，由本研究所篩選的得克利、亞托待克利、貝芬菲克利及賽普護汰寧可有效抑制 3 株菌株菌絲生長，而亞托敏、亞托待克利及賽普護汰寧可顯著降低此病原菌之孢子發芽，於檬果開花期至套袋前應施以防治藥劑與炭疽病共同進行防治時亦可防治由 *P. mangiferae* 引起採後病害。雨季時則應加強藥劑防治，以降低田間病原菌之侵染，達到防治本病害之目的。

誌謝

本研究工作承陳幸葵小姐、吳貽文小姐、王晉鍾先生、曾添水先生及張釗明先生協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Ann, P. J. and H. R. Yang. 2003. Plant Protection 10-Mango Diseases. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture. Taipei. 195 pp. (in Chinese)

Ann, P. J., L. S. Lu, T. Y. Chuang, and C. W. Kao. 1998. Effect of fruit bagging and mulching on control of mango fruit anthracnose disease. Plant Pathol. Bull. 7:19–26.

Avila-Adame, C., G. Olaya, and W. Köller. 2003. Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI fungicides. Plant Dis. 87:1426–1432.

Bhatt, H. R. and K. B. Jadeja. 2010. Mango stem end rot management with carbendazim. Indian Phytopathol. 63:103–105.

Chan, W. L. 2009. Effect of Vapor Heat Treatment on Symptom Development of Anthracnose in Harvested Ripe "Irwin" Mango. Master thesis. Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University. Taipei. 88 pp. (in Chinese with English abstract)

Chen, S. F., D. P. Morgan, J. K. Hasey, K. Anderson, and T. J. Michailides. 2014. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English walnut in California. Plant Dis. 98:636–652.

Cooke, T., D. Persley, and S. House. 2009. Diseases of Fruit Crops in Australia. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO). Canberra. 276 pp.

de Macedo, D. M. and R. W. Barreto. 2008. First record of *Botryosphaeria ribis* associated with leaf spots on *Magnolia* aff. *Candollei* in Brazil. Braz. J. Microbiol. 39:321–324.

de Oliveira Costa, V. S., S. J. Michereff, R. B. Martins, C. A. T. Gava, E. S. G. Mizubuti, and M. P. S. Câmara. 2010. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. Eur. J. Plant Pathol. 127:509–519.

Everett, K. R., P. S. Stevens, and J. G. M. Cutting. 1999. Postharvest fruit rots of avocado are reduced by benomyl applications during flowering. Proceed. New Zealand Plant Protect. Soc. 52:153–156.

Everett, K. R., S. G. Owen, and J. G. M. Cutting. 2005. Testing efficacy of fungicides against postharvest pathogens of avocado (*Persea americana* cv. Hass). Proceed. New Zealand Plant Protect. Soc. 58:89–95.

Gomes, R. R., C. Glienke, S. I. R. Videira, L. Lombard, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2013. *Diaporthe*: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. Persoonia 31:1–41.

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. Taiwan Phytopathological Society. Taichung. 386 pp. (in Chinese)

Huang, S. H. 2005. Integrated control for pear disease. Taichung Dist. Agric. Improv. Stat. 75:305–325. (in Chinese with English abstract)

Iram, S., H. Meer, and I. Ahmad. 2013. Major post-harvest diseases of mango and their management. Int. J. Agron. Plant Product. 4:3470–3484.

Ko, Y., C. W. Liu, C. Y. Chen, S. Maruthasalam, and C. H. Lin. 2009. First report of stem-end rot of mango caused by *Phomopsis mangiferae* in Taiwan. Plant Dis. 93:764.

Kraiczy, P., U. Haase, S. Gencic, S. Flindt, T. Anke, U. Brandt, and G. von Jagow. 1996. The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome bc1, complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center Qp inhibitors. E. J. Biochem. 235:54–63.

Kumah, P., F. Appiah, and J. K. Opoku-Debrah. 2011. Effect of hot water treatment on quality and shelf-life of Keitt mango. Agric. Biol. J. N. Amer. 2:806–817.

Mostert, L., P. W. Crous, J. C. Kang, and A. J. L. Phillips. 2001. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. Mycologia 93:146–167.

Ni, H. F. 2012. Study on Mango Fruit rot Caused by Botryosphaeriaceae. Doctoral thesis. Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University. Taipei. 99 pp. (in Chinese with English abstract)

Ni, H. F., H. R. Yang, R. S. Chen, R. F. Liou, and T. H. Hung. 2012. New Botryosphaeriaceae fruit rot of mango in Taiwan: Identification and pathogenicity. Bot. Stud. 53:467–478.

Pearson, R. C. and A. C. Goheen. 1988. Compendium of Grape Diseases. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 121 pp.

Ploetz, R. C., G. A. Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach, and H. D. Ohr. 1994. Compendium of Tropical Fruit Diseases. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 118 pp.

Punithalingam, E. 1993. *Phomopsis mangiferae*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria. 1168:1–2.

Rosenberger, D. A. and T. J. Burr. 1982. Fruit decays of peach and apple caused by *Phomopsis mali*. Plant Dis. 66:1073–1075.

Rossman, A. Y., D. F. Farr, and L. A. Castlebury. 2007. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. Mycoscience 48:135–144.

Slippers, B. and M. J. Wingfield. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. Fungal Biol. Rev. 21:90–106.

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture (TACTRI / COA). n.d. http://www.tactri.gov.tw/wSite/htdocs/ppmtable/frle-01.pdf (visit on 9/4/2014)

The American Phytopathological Society (APS). 2014. Common Names of Plant Diseases. https://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/default.aspx. (visit on 9/15/2014)

Thompson, S. M., Y. P. Tan, A. J. Young, S. M. Neate, E. A. Aitken, and R. G. Shivas. 2011. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. Persoonia 27:80–89.

Trakunyingcharoen, T., R. Cheewangkoon, C. To-anun, P. W. Crous, J. M. van Niekerk, and L. Lombard. 2014. *Botryosphaeriaceae* associated with diseases of mango (*Mangifera indica*). Aust. Plant Pathol. 43:425–438.

Tsai, Y. P. 2003. Plant Protection 9-Citrus Diseases. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture. Taipei. 378 pp. (in Chinese)

Úrbez-Torres, J. R., F. Peduto, P. M. Vossen, W. H. Krueger, and W. D. Gubler. 2013. Olive twig and branch dieback: Etiology, incidence, and distribution in California. Plant Dis. 97:231–244.

Yu, L., X. L. Chen, L. L. Gao, H. R. Chen, and Q. Huang. 2009. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing canker and shoot blight of eucalyptus in China. Plant Dis. 93:764.

Survey and Fungicides Screening for Mango Postharvest Disease Caused by *Phomopsis mangiferae*

Chiao-Wen Huang[1], Hong-Ren Yang[2], Ching-Yi Lin[1], Sui-Li Hsu[3], Su-Yu Lai[3], Wen-Chi Ko[3], and Hui-Fang Ni[4,*]

Abstract

Huang, C. W., H. R. Yang, C. Y. Lin, S. L. Hsu, S. Y. Lai, W. C. Ko, and H. F. Ni. 2015. Survey and fungicides screening for mango postharvest disease caused by *Phomopsis mangiferae*. J. Taiwan Agric. Res. 64(1):21–31.

Phomopsis mangiferae is one of pathogens causing stem-end rot or fruit rot disease of mango in Taiwan. The objectives of this study were to survey and screen fungicides for mango postharvest diseases caused by *P. mangiferae*. A field survey was performed at Yujing and Guntian Townships in Tainan City during 2009–2011. The results showed this disease incidence was 51.5% in Guntian, greater than 11.9% in Yujing. The results showed that *P. mangiferae* was the major pathogen of stem-end rot or fruit rot disease of mango in Guntian Township. Moreover, three isolates of *P. mangiferae*, Ph-453, Ph-546 and Ph-550, were inoculated on immature mango fruits, and symptom of fruit rot appeared on the fruits after harvest and ripening. Pathogenicity tests indicated that all of three isolates were pathogenic to mango fruit after harvested. The ten fungicides (cyprodinil + fludioxonil, carbendazim + imazalil, iprodione, thiabendazole, carbendazim + hexaconazole, metiram, thiophanate methyl, azoxystrobin + difenoconazole, azoxystrobin and tebuconazole) were tested theirs efficacy on inhibiting mycelial growth and spore germination of *P. mangiferae* Ph-453, Ph-546 and Ph-550 isolates in vitro, respectively. The results showed that tebuconazole, azoxystrobin + difenoconazole, and carbendazim + hexaconazole had more than 97% of inhibition when their effective concentrations were from 10 mg a.i. L^{-1} to 100 mg a.i. L^{-1}. cyprodinil + fludioxonil, azoxystrobin, and azoxystrobin + difenoconazole were effectively inhibited spore germination. These fungicides are currently recommended to the control of anthracnose for mango, and they could also be used to control the postharvest diseases of mango fruit caused by *P. mangiferae* in the field.

Key words: Mango (*Mangifera indica*), Post-harvest diseases, *Phomopsis mangiferae*, Fungicides screening.

Received: September 15, 2014; Accepted: November 24, 2014.

* Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw

[1] Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[2] Research Fellow and Director, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[3] Research Assistants, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[4] Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(1):32–44 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06401.04

研究報告

殺真菌劑對蝴蝶蘭鐮胞菌屬病原菌的生長抑制效果評估

蘇俊峯[1] 李怡靜[2] 簡蘭懿[2] 謝廷芳[3,*]

摘要

蘇俊峯、李怡靜、簡蘭懿、謝廷芳。2015。殺真菌劑對蝴蝶蘭鐮胞菌屬病原菌的生長抑制效果評估。台灣農業研究 64(1):32–44。

鐮胞菌屬病原真菌可引起蝴蝶蘭黃葉病 (*Fusarium solani*)、灰斑病 (*Fusarium oxysporum*) 及黑斑病 (*Fusarium proliferatum*)。本研究在實驗室測試 16 種供試的殺真菌劑對此 3 種病原菌的孢子發芽與菌絲生長的抑制作用，在孢子發芽抑制方面，結果顯示 40% 克熱淨 (iminoctadine triacetate) 與 23.6% 百克敏 (pyraclostrobin) 對黃葉病菌與黑斑病菌的抑制效果最為明顯，稀釋後濃度 10 mg a.i. L^{-1} 時孢子發芽抑制率皆高於 99%。而 50% 三氟敏 (trifloxystrobin) 與 23.6% 百克敏 (pyraclostrobin) 對灰斑病菌的孢子發芽抑制效果最佳，稀釋後濃度 2.5 mg a.i. L^{-1} 時孢子發芽抑制率皆高於 82%。在菌絲生長抑制方面，結果顯示 25% 撲克拉 (prochloraz) 與 50% 撲克拉錳 (prochlorate manganese) 的抑制效果最好，稀釋後濃度 5 mg a.i. L^{-1} 時菌絲生長抑制率皆可達 60% 以上。

關鍵詞：蝴蝶蘭病害、鐮胞菌屬病原菌、殺真菌劑。

前言

根據行政院財政部關務署的統計資料 (Trade Statistics, Customs Administration, Ministry of Finance)，蝴蝶蘭 (*Phalaenopsis*) 為台灣的主要外銷花卉之一。近年來，在蝴蝶蘭栽培期間或在海運的貯運過程中，植株經常出現葉片黃化、落葉，葉鞘出現黑褐色壞疽的病徵，有時在罹病株的葉鞘與根部的黑色壞疽部位，可觀察到成堆的橙紅色子囊殼，嚴重者甚至造成株植死亡，農民俗稱「黑頭」。此病害為蝴蝶蘭黃葉病，由病原真菌 *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. [有性世代為 *Haematonectria haematococca* (Berk & Broome) Samuels & Rossman] 所引起 (Su *et al*. 2012)。

另外，根據 Su *et al*. (2012) 的研究，蝴蝶蘭鐮胞菌屬的病害尚有由病原真菌 *Fusarium oxysporum* Schltdl. 與 *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg 所引起的蝴蝶蘭灰斑病 (gray spot) 與黑斑病 (black spot)。灰斑病主要病徵乃於蝴蝶蘭植株葉片與葉鞘出現不規則至圓形黑褐色病斑，病斑周圍有黃暈，病斑中間則出現灰白色病徵；若病斑出現於葉基部或葉鞘，則容易引起植株葉片黃化的病徵。蝴蝶蘭黑斑病主要病徵乃於蝴蝶蘭植株葉鞘與葉片出現圓形至不規則形的黑色病斑，而有些品種的葉鞘被感染後，葉片有偏黃的現象 (Su *et al*. 2012)。

根據田間病害調查顯示，此 3 種由鐮胞菌屬所引起之蝴蝶蘭病害，目前以蝴蝶蘭黃葉病危害較為普遍，平均發病率介於 20–30%，但在某些蝴蝶蘭品種/系發生較為嚴重，發病率可達 59%，其他兩種病害則較為零星發生。但是近年來台灣溫室設施的設計趨於多樣，造成不同溫室間的微氣候環境有些許的差異，使得

投稿日期：2014 年 9 月 3 日；接受日期：2014 年 11 月 27 日。
* 通訊作者：tfhsieh@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所花卉研究中心研究員兼中心主任。台灣 雲林縣。

黑斑病與灰斑病發生漸趨嚴重。然而，目前並無有效可供推薦施用於田間防治此 3 種病害的方法，因此本研究擬先於實驗室針對上述 3 種病原菌，篩選具有效抑菌效果的殺真菌劑，期能提供往後田間病害防治參考。

材料與方法

供試菌株的培養與接種源的製備

供試的 3 個鐮胞菌菌株包括 FST1 為蝴蝶蘭黃葉病菌 *F. solani*，F0217-23 為蝴蝶蘭黑斑病菌 *F. proliferatum*，N8284 為蝴蝶蘭灰斑病菌 *F. oxysporum*。將供試菌株 FST1、F0217-23 及 N8284 單胞培養於 PDA 斜面試管培養基中 7–14 d 後，於該培養試管中加入 9 mL 無菌水，利用移殖環刮取菌落表面，並將該懸浮液經 4 層滅菌紗布過濾後，震盪混合均勻。於光學顯微鏡下，利用血球計數器 (hemocytometer, Marienfeld, Germany) 計算單位體積的孢子數，並換算為孢子懸浮液的濃度，再利用無菌水調整供試菌株孢子懸浮液濃度至 1–4 × 10^5 spores mL^{-1}。若以移殖環沾取部分供試菌株分生孢子，於 2% 的水瓊脂培養基 (2% water agar; WA) 上畫線培養，經 12 h 後，單胞培養於馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (potato dextrose agar, PDA, Difco) 平板 3–5 d，以 8-mm 打孔器切取菌落周圍菌絲，將菌絲塊的菌絲面朝下置於新配置 PDA 培養基平板上培養，備用。

供試殺真菌劑

供試的殺真菌劑如表 1 所列 (含中文名、有效成分、廠商)，包括菲克利、保粒黴素甲、亞托敏、百克敏、待克利、撲克拉、依得利、克熱淨、腐絕、免賴得、白克列、貝芬替、撲克拉錳、脫克松、三氟敏及甲基多保淨等 16 種。

殺真菌劑對蝴蝶蘭鐮胞菌屬病原菌孢子發芽的影響

利用 1% 葡萄糖溶液調配上述 16 種供試殺真菌劑的稀釋後濃度分別為 5、20 及 80 mg a.i. L^{-1}，並以無添加殺真菌者為對照組。取八孔玻片，將每 10 μL 的供試蝴蝶蘭黃葉病菌 FST1 孢子懸浮液 (1–4 × 10^5 spores mL^{-1}) 滴置於八孔玻片的其中一個孔洞上，再分別加入 10 μL 的不同濃度的殺真菌劑溶液混合均勻，使單孔洞總體積達 20 μL，則供試殺真菌劑的最終的稀釋後濃度為 2.5、10 及 40 mg a.i. L^{-1}，而對照組為 0.5% 葡萄糖溶液。隨即將八孔玻片放置於 36℃定溫箱 (24 h 光照) 中，16 h 後觀察孢子發芽的情形，並計算孢子發芽率 (%)。處理間再與對照組比較，換算孢子發芽抑制率 (conidiospore germination inhibition rate, %)。計算孢子發芽抑制率 (%) = [(對照組孢子發芽率 − 不同殺真菌劑處理所得之孢子發芽率)/對照組孢子發芽率] × 100 (%)。另一試驗為測試殺真菌劑對蝴蝶蘭黑斑病菌 F0217-23 孢子發芽的影響時，則以無菌水調配上述 16 種供試殺真菌劑最終的稀釋後濃度為 2.5、10 及 40 mg a.i. L^{-1}，並以無菌水當對照組，供試的八孔玻片放置在 36℃定溫箱 (24 h 光照) 中。而測試化學藥劑對蝴蝶蘭灰斑病菌 N8284 孢子發芽的影響時，則利用 1% 果膠溶液調配上述 16 種供試殺真菌劑最終的稀釋後濃度為 2.5、10 及 40 mg a.i. L^{-1}，而對照組為 0.5% 的果膠溶液，供試的八孔玻片則放置於 28℃定溫箱 (24 h 光照) 中。

殺真菌劑對蝴蝶蘭鐮胞菌屬病原菌菌絲生長的影響

盛裝於三角燒瓶內、經高溫高壓滅菌後的 PDA 培養基，待其冷卻約至 60–70℃時，取 15 種供試殺真菌劑分別添加於該些三角燒瓶內，並調配製成稀釋後濃度分別為 5、20、80 及 160 mg a.i. L^{-1} 各式殺真菌劑的供試培養基平板，並以無添加殺真菌劑者為對照組。將供試菌株 FST1、F0217-23 及 N8284 分別培養於 PDA 培養基平板 3–5 d，以 8-mm 打孔器切取平板培養基上之菌絲尖端菌絲塊，並移置接種於已添加殺真菌劑的 PDA 培養基平板上，每種供試殺真菌劑、每種濃度分別接種 6 皿培養基。完成接種之 PDA 平板放置於室溫 (24–28℃，12 h 光照) 下，每天觀察、記錄菌

表 1. 本研究使用的殺真菌劑種類。

Table 1. The list of fungicides used in this study.

Fungicide	Chinese name	Active ingredient	Manufacture
5% hezaconazole suspension concentrates (SC)	5% 菲克利水懸劑	(RS)-2-(2,4-dichlorophenyl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) hexan-2-ol	Sinon Corporation Co., Ltd., Taichung
10% polyoxins wettable powders (WP)	10% 保粒黴素甲可濕性粉劑	5- (2-amino-5-O-carbamoyl-2- deoxy-L-xylonamido)- 1,5- dideoxy-1-1,2,3,4-tetrahydro-5-hydroxymethyl- 2,4-dioxopyrimidin-1-yl-β-D-allofuranuronic acid	Sinon Corporation Co., Ltd., Taichung
23% azoxystrobin SC	23% 亞托敏水懸劑	Methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy) pyrimidin-4- yloxy] phenyl} -3- methoxyacrylate	Chia Tai Enterprise Co., Ltd., Taipei
23.6% pyraclostrobin emulsifiable concentrates (EC)	23.6% 百克敏乳劑	Methyl N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1H- pyrazol-3- yloxymethyl] phenyl} (N-methoxy) carbamate	BASF Taiwan Co., Ltd., Taipei
24.9% difenoconazole EC	24.9% 待克利乳劑	cis,trans-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)- 1,3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ether	Sinon Corporation Co., Ltd., Taichung
25% prochloraz EC	25% 撲克拉乳劑	N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy) ethyl] imidazole- 1-carboxamide	Sinon Corporation Co., Ltd., Taichung
35% etridiazole WP	35% 依得利可濕性粉劑	Ethyl 3-trichloromethyl-1,2,4-thiadiazol-5-yl ether	Great Victory Chemical Industry Co., Ltd., Yunlin
40% iminoctadine triacetate WP	40% 克熱淨可濕性粉劑	1,1’-iminodi(octamethylene)diguanidinium tris (alkylbenzenesulfonate)	Sumitomo Crop Taiwan Co., Ltd., Taipei
41.8% thiabendazole SC	41.8% 腐絕水懸劑	2-(thiazol-4-yl) benzimidazole	Sinon Corporation Co., Ltd., Taichung
50% benomyl WP	50% 免賴得可濕性粉劑	Methyl 1-(butylcarbamoyl) benzimidazol-2- yl-carbamate	Sinon Corporation Co., Ltd., Taichung
50% boscalid water-dispersible granules (WG)	50% 白克列水分散性粒劑	2-chloro-N-(4’-chlorobiphenyl-2-yl) nicotinamide	BASF Taiwan Co., Ltd., Taipei
50% carbendazim WP	50% 貝芬替可濕性粉劑	Methyl benzimidazol-2-ylcarbamate	Sinon Corporation Co., Ltd., Taichung
50% prochlorate manganese WP	50% 撲克拉錳可濕性粉劑	Dichlorotetrakis (N-propyl-N- (2-(2,4,6- trichlorophenoxy)- ethyl) imidazole-1-carboxamide) manganese (II)	Bayer Taiwan Co., Ltd., Taoyuan
50% tolclofos-methyl WP	50% 脫克松可濕性粉劑	O-2,6-dichloro-p-tolyl O,O-dimethyl phosphorothioate	Lihnung Chemical Co., Ltd. Yunlin
50% trifloxystrobin WG	50% 三氟敏水分散性粒劑	Methyl (E)-methoxyimino-{(E)-α-[1-(α,α,α-trifluoro-m-tolyl) ethylideneaminooxy]-o-tolyl} acetate	Bayer Taiwan Co., Ltd., Taoyuan
70% thiophanate-methyl WP	70% 甲基多保淨可濕性粉劑	Dimethyl 4,4’-(o-phenylene) bis(3-thioallophanate)	Sinon Corporation Co., Ltd., Taichung

絲生長的情形，並計算菌絲生長速度 (mm d^{-1})，處理間再與對照組比較，換算菌絲生長抑制率 (mycelial growth inhibition rate, %)。菌絲生長抑制率 (%) = [(對照組菌絲生長速度 − 不同殺真菌劑處理所得之菌絲生長速度)/對照組菌絲生長速度] × 100 (%)。

資料統計分析

試驗所得資料之差異顯著性測驗，係利用 IBM SPSS Statistics (version 19) 統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 與最低顯著差異分析 (least significant difference; LSD)。

結果

殺真菌劑對蝴蝶蘭黃葉病菌孢子發芽與菌絲生長的影響

取 16 種供試殺真菌劑測試其對蝴蝶蘭黃葉病菌孢子發芽的影響，試驗處理後 16 h，計算對照組 0.5% 葡萄糖溶液處理的孢子發芽率為 86%。比較供試殺真菌劑對黃葉病菌孢子發芽的抑制情形，結果稀釋後濃度 10 mg a.i. L^{-1} 的 40% 克熱淨與 40 mg a.i. L^{-1} 的 23.6% 百克敏均可完全抑制黃葉病菌孢子發芽。其次為稀釋後濃度 40 mg a.i. L^{-1} 的 50% 三氟敏，對黃葉病菌的孢子發芽抑制率為 71%。而其他不同供試殺真菌劑稀釋後濃度對黃葉病菌孢子發芽抑制率，皆低於 23%，其中的 24.9% 待克利、35% 依得利、50% 白克列、50% 貝芬替、50% 撲克拉錳及 70% 甲基多保淨在測試的濃度下更完全無法抑制孢子發芽 (表 2)。

取 15 種供試殺真菌劑測試其對蝴蝶蘭黃葉病菌菌絲生長的影響，試驗處理後第 4 d，計算對照組無添加殺真菌劑處理，其菌絲生長速度為 10.2 mm d^{-1}。比較供試殺真菌劑對黃

表 2. 供試殺真菌劑對蝴蝶蘭黃葉病菌孢子發芽與菌絲生長的抑制效果。

Table 2. The effects of fungicides on inhibitions of conidiospore germination and mycelial growth of *Fusarium solani* causing yellow leaf of *Phalaenopsis*.

Fungicide[z]	AI[y] (mg a.i. L^{-1})	Conidiospore germination inhibition rate (%)	AI (mg a.i. L^{-1})	Mycelial growth inhibition rate (%)
5% hezaconazole	2.5	0.0 a[x]	5	11.0 d
	10.0	1.0 a	20	22.8 c
	40.0	3.3 a	80	33.9 b
			160	39.6 a
10% polyoxins	2.5	0 b	5	0.0 c
	10.0	1.8 b	20	0.0 c
	40.0	13.5 a	80	1.2 b
			160	9.4 a
23% azoxystrobin	2.5	3.7 b	5	26.5 d
	10.0	22.6 a	20	33.1 c
	40.0	19.7 a	80	40.4 b
			160	42.4 a
23.6% pyraclostrobin	2.5	72.2 b	5	42.0 d
	10.0	99.4 a	20	45.7 c
	40.0	100.0 a	80	47.7 b
			160	50.6 a
24.9% difenoconazole	2.5	0.0 a	5	31.4 d
	10.0	0.0 a	20	42.9 c
	40.0	0.0 a	80	56.7 b
			160	62.0 a
25% prochloraz	2.5	0.0 b	5	72.7 d
	10.0	0.0 b	20	84.5 c
	40.0	4.9 a	80	96.4 b
			160	100.0 a
35% etridiazole	2.5	0.0 a[x]	5	0.0 a
	10.0	0.0 a	20	0.0 a
	40.0	0.0 a	80	0.0 a
			160	0.0 a

表 **2.** 供試殺真菌劑對蝴蝶蘭黃葉病菌孢子發芽與菌絲生長的抑制效果效果。(續)

Table 2. The effects of fungicides on inhibitions of conidiospore germination and mycelial growth of *Fusarium solani* causing yellow leaf of *Phalaenopsis*. (continued)

Fungicide[z]	AI[y] (mg a.i. L^{-1})	Conidiospore germination inhibition rate (%)	AI (mg a.i. L^{-1})	Mycelial growth inhibition rate (%)
40% iminoctadine triacetate	2.5	10.9 b[x]	5	22.8 c
	10.0	100.0 a	20	24.1 c
	40.0	100.0 a	80	41.2 b
			160	48.2 a
41.8% thiabendazole	2.5	0.0 a	5	4.9 d
	10.0	4.9 a	20	17.1 c
	40.0	7.8 a	80	60.0 b
			160	80.0 a
50% benomyl	2.5	9.6 a	5	1.2 d
	10.0	0.0 b	20	13.5 c
	40.0	0.0 b	80	27.3 b
			160	36.0 a
50% boscalid	2.5	0.0 a	5	1.6 a
	10.0	0.0 a	20	1.2 a
	40.0	0.0 a	80	2.4 a
			160	2.0 a
50% carbendazim	2.5	0.0 a	5	4.1 c
	10.0	0.0 a	20	12.7 b
	40.0	0.0 a	80	13.9 b
			160	17.9 a
50% prochlorate manganese	2.5	0.0 a	5	76.3 c
	10.0	0.0 a	20	84.5 b
	40.0	0.0 a	80	99.8 a
		-	160	100.0 a
50% tolclofos methyl	2.5	1.6 a	5	-
	10.0	3.6 a	20	-
	40.0	8.3 a	80	-
50% trifloxystrobin	2.5	11.1 c	5	39.2 c
	10.0	39.6 b	20	42.4 b
	40.0	71.3 a	80	46.5 a
		-	160	47.8 a
70% thiophanate methyl	2.5	0.0 a	5	6.9 c
	10.0	0.0 a	20	20.0 b
	40.0	0.0 a	80	26.9 a
		-	160	28.6 a

[z] The basic data of fungicides were listed in Table 1.
[y] AI: Active ingredient concentration.
[x] Means within a column with the same fungicide treatment followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

葉病菌菌絲生長抑制情形，結果 25% 撲克拉與 50% 撲克拉錳的抑制效果最為明顯，該些殺真菌劑在稀釋後濃度 5 mg a.i. L^{-1} 時即對黃葉病菌菌絲生長有抑制作用，菌絲生長抑制率皆高於 72%，而添加的濃度越高，對菌絲生長的抑制作用也越明顯，在稀釋後濃度 160 mg

a.i. L^{-1} 時兩者均可完全抑制菌絲生長。其次為 41.8% 腐絕，在稀釋後濃度為 80 與 160 mg a.i. L^{-1} 時，其對黃葉病菌的菌絲生長抑制率分別為 60% 與 80%；而 35% 依得利在測試的稀釋後濃度下則完全無法抑制菌絲生長 (表 2)。

殺真菌劑對蝴蝶蘭黑斑病菌菌絲生長與孢子發芽的影響

取 16 種供試殺真菌劑測試其對蝴蝶蘭黑斑病菌孢子發芽的影響，試驗處理後 16 h，計算對照組無菌水處理的孢子發芽率為 91%。比較供試殺真菌劑對黑斑病菌孢子發芽的抑制情形，結果 40% 克熱淨與 23.6% 百克敏的抑制效果最為明顯，在稀釋後濃度 2.5 mg a.i. L^{-1} 時即有抑制作用，其孢子發芽抑制率皆高於 81%，而添加的濃度越高，對孢子發芽的抑制作用也越明顯。在稀釋後濃度為 10 mg a.i. L^{-1} 時，兩者均可完全抑制孢子發芽率。其次為 50% 三氟敏與 23% 亞托敏，在稀釋後濃度為 2.5、10 及 40 mg a.i. L^{-1} 的 50% 三氟敏對黑斑病菌的孢子發芽抑制率分別為 70、82 及 71%，而稀釋後濃度為 10 與 40 mg a.i. L^{-1} 的 23% 亞托敏對黑斑病菌的孢子發芽抑制率分別為 67% 與 91%。然而，50% 撲克拉錳在測試的濃度下均無法有效抑制孢子發芽(表 3)。

取 15 種供試殺真菌劑測試其對蝴蝶蘭黑斑病菌菌絲生長的影響，試驗處理後第 11 d，計算對照組無添加殺真菌劑處理，其菌絲生長速度為 2.6 mm d^{-1}。比較供試殺真菌劑對黑斑病菌菌絲生長抑制情形，結果 25% 撲克拉與 50% 撲克拉錳的抑制效果最為明顯，稀釋後濃度為 5 mg a.i. L^{-1} 時即對黑斑病菌絲生長有有抑制作用，菌絲生長抑制率皆高於 60%，而隨著添加的濃度越高，抑制作用也越明顯，兩者在稀釋後濃度為 160 mg a.i. L^{-1} 時可完全抑制菌絲生長。其次為腐絕與待克利，41.8% 腐絕的稀釋後濃度為 80 與 160 mg a.i. L^{-1} 時，對黑斑病的菌絲生長抑制率分別為 63% 與 77%，而 24.9% 待克利在稀釋後濃度為 5、20、80 及 160 mg a.i. L^{-1} 時，對黑斑病的菌絲生長抑制率介於 43–74% 之間。另外，35% 依得利與 50% 白克列在測定濃度下對黑斑病菌菌絲生長完全無抑制作用 (表 3)。

殺真菌劑對蝴蝶蘭灰斑病菌菌絲生長與孢子發芽的影響

取 16 種供試殺真菌劑測試其對蝴蝶蘭灰斑病菌孢子發芽的影響，試驗處理後 16 h，計算對照組 0.5% 果膠溶液處理的孢子發芽率為 86%。比較供試殺真菌劑對灰斑病菌孢子發芽的抑制情形，結果 23.6% 百克敏的抑制效果最為明顯，稀釋後濃度為 2.5 mg a.i. L^{-1} 時即有抑制作用，其孢子發芽抑制率為 98%，而稀釋後濃度為 10 mg a.i. L^{-1} 時即可完全抑制孢子發芽。其次為 50% 三氟敏，稀釋後濃度為 2.5 mg a.i. L^{-1} 時，孢子發芽抑制率為 82%，然而 24.9% 待克利、50% 撲克拉錳在測試的濃度下均無法抑制灰斑病菌之孢子發芽率 (表 4)。

取 15 種供試殺真菌劑測試其對蝴蝶蘭灰斑病菌菌絲生長的影響，試驗處理後第 13 d，計算對照組無添加殺真菌劑處理，其菌絲生長速度為 2.9 mm d^{-1}。比較供試殺真菌劑對灰斑病菌菌絲生長抑制情形，結果 25% 撲克拉、50% 貝芬替及 50% 撲克拉錳的抑制效果最為明顯，稀釋後濃度為 5 mg a.i. L^{-1} 時即有抑制作用，菌絲生長抑制率皆高於 84%，而添加的濃度越高，對菌絲生長的抑制作用也越明顯。其次為 41.8% 腐絕及 50% 免賴得，稀釋後濃度為 20 mg a.i. L^{-1} 時菌絲生長抑制率皆高於 99%。在測試的藥劑之中，稀釋後濃度 80 mg a.i. L^{-1} 的 41.8% 腐絕、80 mg a.i. L^{-1} 的 50% 免賴得、160 mg a.i. L^{-1} 的 50% 貝芬替及 160 mg a.i. L^{-1} 的 50% 撲克拉錳可完全抑制菌絲生長，然而 35% 依得利與 50% 白克列在測定濃度下對灰斑病菌菌絲生長完全無抑制作用 (表 4)。

討論

在篩選化學藥劑用於防治作物病害之時，通常會先進行 *in vitro* 的篩選試驗，包括化學藥劑對病原菌孢子發芽與菌絲生長的抑制作用 (Hibar *et al*. 2007; Naik *et al*. 2008; Dam *et al*. 2010)。本研究測試 16 種供試殺真菌劑對蝴蝶蘭黃葉病菌、黑斑病菌及灰斑病菌孢子

表 3. 供試殺真菌劑對蝴蝶蘭黑斑病菌孢子發芽與菌絲生長的抑制效果。

Table 3. The effects of fungicides on inhibitions of conidiospore germination and mycelial growth of *Fusarium proliferatum* causing black spot of *Phalaenopsis*.

Fungicide[z]	AI[y] (mg a.i. L^{-1})	Conidiospore germination inhibition rate (%)	AI (mg a.i. L^{-1})	Mycelial growth inhibition rate (%)
5% hezaconazole	2.5	20.2 b[x]	5	13.9 c
	10.0	76.8 a	20	31.7 b
	40.0	77.2 a	80	52.0 a
			160	54.8 a
10% polyoxins	2.5	0.0 c	5	0.0 b
	10.0	12.9 b	20	0.0 b
	40.0	54.2 a	80	0.0 b
			160	9.5 a
23% azoxystrobin	2.5	40.0 c	5	20.1 c
	10.0	66.5 b	20	26.7 b
	40.0	90.7 a	80	33.0 a
			160	33.4 a
23.6% pyraclostrobin	2.5	90.0 b	5	26.4 b
	10.0	100.0 a	20	35.7 a
	40.0	100.0 a	80	38.1 a
			160	40.3 a
24.9% difenoconazole	2.5	19.3 b	5	43.8 d
	10.0	19.5 b	20	57.8 c
	40.0	37.5 a	80	69.3 b
			160	73.3 a
25% prochloraz	2.5	0.0 b	5	60.1 c
	10.0	7.9 a	20	83.8 b
	40.0	14.2 a	80	98.9 a
			160	100.0 a
35% etridiazole	2.5	9.7 b	5	0.0 a
	10.0	23.1 b	20	0.0 a
	40.0	47.7 a	80	0.0 a
			160	0.0 a
40% iminoctadine triacetate	2.5	81.6 b	5	0.0 d
	10.0	100.0 a	20	8.6 c
	40.0	100.0 a	80	29.3 b
			160	35.7 a
41.8% thiabendazole	2.5	0.0 b	5	0.0 d
	10.0	6.1 b	20	34.0 c
	40.0	42.3 a	80	63.0 b
			160	76.8 a
50% benomyl	2.5	5.0 b	5	14.3 b
	10.0	11.4 b	20	37.3 a
	40.0	41.2 a	80	42.9 a
			160	42.1 a

表 3. 供試殺真菌劑對蝴蝶蘭黑斑病菌孢子發芽與菌絲生長的抑制效果。(續)

Table 3. The effects of fungicides on inhibitions of conidiospore germination and mycelial growth of *Fusarium proliferatum* causing black spot of *Phalaenopsis*. (continued)

Fungicide[z]	AI[y] (mg a.i. L^{-1})	Conidiospore germination inhibition rate (%)	AI (mg a.i. L^{-1})	Mycelial growth inhibition rate (%)
50% boscalid	2.5	12.6 a[x]	5	0.0 a
	10.0	12.7 a	20	0.0 a
	40.0	18.3 a	80	0.0 a
			160	0.0 a
50% carbendazim	2.5	0.8 b	5	35.7 b
	10.0	18.2 a	20	45.5 a
	40.0	21.0 a	80	47.8 a
			160	45.7 a
50% prochlorate manganese	2.5	0.0 a	5	71.1 c
	10.0	0.0 a	20	94.9 b
	40.0	0.0 a	80	99.5 a
			160	100.0 a
50% tolclofos methyl	2.5	0.0 a	5	-
	10.0	10.4 a	20	-
	40.0	10.0 a	80	-
50% trifloxystrobin	2.5	70.2 a	5	34.5 b
	10.0	81.9 a	20	39.8 a
	40.0	71.3 a	80	43.9 a
			160	43.9 a
70% thiophanate methyl	2.5	23.3 a	5	30.7 b
	10.0	37.1 a	20	49.1 a
	40.0	47.6 a	80	49.5 a
			160	52.5 a

[z] The basic data of fungicides were listed in Table 1.
[y] AI: Active ingredient concentration.
[x] Means within a column with the same fungicide treatment followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

發芽的抑制作用，結果以百克敏、克熱淨及三氟敏的抑制效果最為明顯 (表 2、3、4)。根據 2011 年行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所所編農藥作用機制分類檢索紀載：百克敏屬甲氧基胺基甲酸酯類 (methoxycarbamates) 殺菌劑，三氟敏屬肟乙酸酯類 (oximino acetates) 殺菌劑。兩者主要作用於粒腺體電子傳遞複合物 III 細胞色素 bc1 (Qo) [complex III: cytochrome bc1 (ubiquinol oxidase at Qo site)] 上，抑制病原菌的呼吸作用。而克熱淨屬胍類 (guanidines) 殺菌劑，為多重抑制作用 (multi-site contact activity)，主要影響病原真菌的細胞膜與脂質的生合成，但是有別於抑制病原菌膜固醇的合成作用。百克敏雖然為非系統性殺菌劑，但是可進行植物組織間的跨層轉移 (translaminar) 而移行，可當作保護劑與局部治療劑，對 *Alternaria solani*、*Cercospora kikuchii*、*Guignardia citricarpa*、*Mycosphaerella fijiensis*、*Phakopsora pachyrhizi*、*Phytophthora infestans*、*Plasmopara viticola*、*Puccinia* spp.、*Pyrenophora teres*、*Pythium aphanidermatum*、*Rhizoctonia solani*、*Septoria tritici*、*Septoria*

表 **4.** 供試殺真菌劑對蝴蝶蘭灰斑病菌孢子發芽與菌絲生長的抑制效果。

Table 4. The effects of fungicides on inhibitions of conidiospore germination and mycelial growth of *Fusarium oxysporum* causing gray spot of *Phalaenopsis*.

Fungicide[z]	AI[y] (mg a.i. L^{-1})	Conidiospore germination inhibition rate (%)	AI (mg a.i. L^{-1})	Mycelial growth inhibition rate (%)
5% hezaconazole	2.5	0.0 b[x]	5	43.5 d
	10.0	0.0 b	20	53.1 c
	40.0	16.7 a	80	63.0 b
			160	72.6 a
10% polyoxins	2.5	42.7 a	5	0.0 b
	10.0	42.1 a	20	0.0 b
	40.0	26.0 b	80	5.7 a
			160	3.1 ab
23% azoxystrobin	2.5	45.8 c	5	43.0 d
	10.0	69.0 b	20	51.3 c
	40.0	79.3 a	80	61.3 b
			160	64.3 a
23.6% pyraclostrobin	2.5	98.9 b	5	53.5 b
	10.0	100.0 a	20	61.7 a
	40.0	100.0 a	80	62.6 a
			160	63.9 a
24.9% difenoconazole	2.5	0.0 a	5	57.4 d
	10.0	0.0 a	20	73.4 c
	40.0	0.0 a	80	82.6 b
			160	85.7 a
25% prochloraz	2.5	0.0 b	5	84.1 c
	10.0	0.0 b	20	95.2 b
	40.0	51.5 a	80	99.0 a
			160	99.9 a
35% etridiazole	2.5	0.0 b	5	0.0 a
	10.0	47.2 a	20	0.0 a
	40.0	50.6 a	80	0.0 a
			160	0.0 a
40% iminoctadine triacetate	2.5	31.1 c	5	0.0 c
	10.0	52.2 b	20	4.2 b
	40.0	80.2 a	80	27.8 a
			160	28.3 a
41.8% thiabendazole	2.5	13.3 b	5	13.8 b
	10.0	35.0 a	20	99.7 a
	40.0	43.2 a	80	100.0 a
			160	100.0 a
50% benomyl	2.5	14.1 a	5	74.0 b
	10.0	21.4 a	20	99.5 a
	40.0	22.4 a	80	100.0 a
			160	100.0 a

表 4. 供試殺真菌劑對蝴蝶蘭灰斑病菌孢子發芽與菌絲生長的抑制效果。(續)

Table 4. The effects of fungicides on inhibitions of conidiospore germination and mycelial growth of *Fusarium oxysporum* causing gray spot of *Phalaenopsis*. (continued)

Fungicide[z]	AI[y] (mg a.i. L^{-1})	Conidiospore germination inhibition rate (%)	AI (mg a.i. L^{-1})	Mycelial growth inhibition rate (%)
50% boscalid	2.5	25.7 b[x]	5	0.0 a
	10.0	33.0 b	20	0.0 a
	40.0	33.7 a	80	0.0 a
			160	0.0 a
50% carbendazim	2.5	22.6 b	5	88.3 b
	10.0	61.7 a	20	97.9 a
	40.0	67.2 a	80	98.9 a
			160	100.0 a
50% prochlorate manganese	2.5	0.0 a[x]	5	90.0 b
	10.0	0.0 a	20	99.1 a
	40.0	0.0 a	80	99.7 a
			160	100.0 a
50% tolclofos methyl	2.5	51.7 a	5	-
	10.0	53.7 a	20	-
	40.0	59.5 a	80	-
50% trifloxystrobin	2.5	82.6 a	5	57.4 a
	10.0	84.3 a	20	57.8 a
	40.0	87.9 a	80	58.3 a
			160	60.4 a
70% thiophanate methyl	2.5	0.0 b	5	0.0 c
	10.0	14.0 a	20	77.3 b
	40.0	14.4 a	80	87.4 a
			160	87.4 a

[z] The basic data of fungicides were listed in Table 1.
[y] AI: Active ingredient concentration.
[x] Means within a column with the same fungicide treatment followed by the same letter are not significantly different at 5% level by LSD test.

glycines 及 *Uncinula necator* 等病原菌所引起的病害有防治效果 (Tomlin 2003)。三氟敏為中間型 (mesostemic) 殺菌劑，可進行植物組織間的跨層轉移而移行，亦可經藉由植物的蒸散作用進行系統性移行。三氟敏為廣效性殺菌劑，對於子囊菌 (Ascomycetes)、不完全菌 (Deuteromycetes)、擔子菌 (Basidiomycetes) 及卵菌 (Oomycetes) 所引起的病害皆有防治效果，主要施用於作物地上部，可當作保護劑與局部治療劑，但是不耐雨水沖刷 (Tomlin 2003)。克熱淨為非系統性、接觸型殺菌劑，可當作保護劑施用，對 *Alternaria* spp.、*Botryosphaeria* spp.、*Fusarium* spp.、*Gloeodes* spp.、*Helminthosporium gramineum*、*Penicillium* spp.、*Septoria* spp.、*Tilletia* spp. 及 *Zygophiala* spp. 等病原菌所引起的病害有防治效果 (Tomlin 2003)。

Ellis *et al*. (2011) 利用百克敏預先處理大豆種子 (9.9 g 100 kg^{-1})，結果可以有效減少大豆種子受到 *Fusarium graminearum* 的感染。Taj & Kumar (2013) 以 10 mg L^{-1} 三氟敏測試其對薑黃葉病 (ginger yellows) 病原菌 *F.*

oxysporum f. sp. *zingiberi* 菌絲生長的抑制作用，結果菌絲生長抑制率可達 75%。若以 10 mg L^{-1} 的三氟敏與貝芬替混合使用，結果菌絲生長抑制率則高達 92%。Chen *et al*. (2012) 則利用百克敏與依普座 (epoxiconazole) 混合施用，則可於田間有效防治由 *F. asiaticum* 與 *F. graminearum* 所引起的小麥赤黴病 (Fusarium head blight)，防治效果可達 85% (發病率與無施藥劑處理比較之結果)。然而多種藥劑之混合施用，是否亦能提高對鐮胞菌所引起蝴蝶蘭病害的防治效果，則有待進一步試驗證明。

本研究挑選 15 種供試殺真菌劑並測試其對蝴蝶蘭黃葉病菌、黑斑病菌及灰斑病菌的菌絲生長抑制作用，結果以撲克拉與撲克拉錳的抑制效果最為明顯 (表 2–4)，說明二者對鐮胞菌引起的病害有治療性。根據 2011 年行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所所編的農藥作用機制分類檢索紀載：撲克拉與撲克拉錳皆屬咪唑類殺菌劑 (imidazoles)，主要作用於固醇合成之 C14 去甲基酶 (C14-demethylase in sterol biosynthesis) 上，抑制病原菌膜固醇的合成。另外在聯合國糧食與農業組織於 2009 年發表 FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides 對撲克拉的評估報告中：撲克拉為非系統性、接觸型殺菌劑，可當作保護劑與治療劑使用，並可穩定地與其他金屬離子結合製成新藥劑，如撲克拉錳。撲克拉為廣效性殺菌劑，但在防治子囊真菌 (ascomycetes) 與不完全真菌 (fungi imperfecti) 的病害上效果更明顯。目前已被使用在多種農藝與園藝作物上，包括由病原菌 *Alternaria* spp.、*Ascochyta* spp.、*Botrytis* spp.、*Colletotrichum* spp.、*Pseudocercosporella* spp.、*Pyrenopeziza* spp.、*Pyrenophora* spp.、*Pyricularia* spp.、*Rhynchosporium* spp.、*Septoria* spp. 及 *Sclerotinia* spp. 等所引起的作物病害。

已有文獻報導撲克拉對鐮胞菌屬病原菌 (*Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* 及 *F. verticillioides*) 的菌絲生長有良好的抑制作用 (Ivić *et al*. 2011)。另外，Mateo *et al*. (2011) 報導指出撲克拉除可以抑制穀類穗腐病 (Fusarium head blight) 病原菌 (*Fusarium langsethiae*) 的菌絲生長之外，並且可以抑制該病原菌的 HT-2 toxin 產生。由於撲克拉錳對蝴蝶蘭黃葉病菌的菌絲生長具有強的抑制能力，理論上應對其所引起的病害有治療效果。然而，本研究先行於蝴蝶蘭接種黃葉病菌後，分別於接種後第 1、2、3 及 4 d 施用 6,000 倍撲克拉錳稀釋液，但亦無法有效降低黃葉病的發病度 (資料未發表)。未來應設法改善撲克拉錳的施用方法，才能於田間有效地治療蝴蝶蘭黃葉病。

貝芬替對灰斑病菌菌絲生長的抑制效果，與撲克拉與撲克拉錳的結果相類似 (表 4)。根據 2011 年行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所所編農藥作用機制分類檢索紀載：貝芬替屬苯併咪唑類殺菌劑 (benzimidazoles)，主要作用於有絲分裂微管蛋白聚合 (β-tubulin assembly in mitosis) 上，抑制病原菌的有絲分裂與細胞分裂，可抑制病原菌附著器 (appressoria) 的形成與抑制菌絲生長。貝芬替為系統性殺菌劑，可當作保護劑與局部治療劑，對 *Alternaria* spp.、*Botrytis* spp.、*Cercospora* spp.、*Cladosporium* spp.、*Cylindrosporium* spp.、*Erysiphe* spp.、Fusarium spp.、*Monilia* spp.、*Pesudocercosporella* spp.、*Podosphaera* spp.、*Rhizoctonia* spp.、*Septoria* spp.、*Sclerotinia* spp.、*Tilletia* spp.、*Uncinula* spp.、*Ustilago* spp. 及 *Venturia* spp. 等病原菌所引起的病害有防治效果 (Tomlin 2003)。Meena & Maharshi (2013) 曾報導指出利用貝芬替 (2 g kg^{-1}) 處理卵葉車前 (*Plantago ovata*) 種子，可有效防治由 *Fusarium semitectum* 所引起的種子病害。Omar *et al*. (2006) 亦曾報導高濃度的貝芬替 (> 50 μg mL^{-1}) 可減少番茄冠腐與根腐病 (Fusarium crown and root rot，病原菌 *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*) 的發生達 50% 以上，但是施用低濃度貝芬替 (10 μg mL^{-1}) 時，則防治效果不明顯。進一步，Omar *et al*. (2006) 選用對貝芬替具有高耐性的生物防治微生物菌株 Bacillus megaterium (c96) 與 Burkholderia cepacia (c91)，搭配低濃度的貝芬替 (10 μg mL^{-1}) 混合施用，則防治番茄冠腐與根腐病的效果可與施用高濃度的貝芬替相當。因此，尋求有益微生物的配合施用，或許可增加化學藥劑在蝴

蝶蘭鐮胞菌病害的防治效果，並且可減少化學藥劑的使用量與濃度。

另外，本研究發現撲克拉對蝴蝶蘭黃葉病菌的孢子發芽抑制能力低，且撲克拉錳幾乎無抑制作用，即對其所引起的病害無預防效果。Liao *et al*. (2012) 在溫室於植株上測試撲克拉錳對蝴蝶蘭黃葉病的防治效果，經 3 次試驗結果顯示：施用撲克拉錳的效果不一，第一次試驗具有良好防治效果，但是第 2、3 次試驗卻出現防治效果不彰的結果。Liao *et al*. (2012) 認為撲克拉錳為非系統性藥劑，病原菌容易經傷口侵入無藥劑保護的植物組織而發病，此亦印證撲克拉錳無預防性的功效。同樣的，本研究先行於溫室評估撲克拉錳對蝴蝶蘭黃葉病的預防效果，結果先行施用稀釋後濃度為 160 mg a.i. L^{-1} 的撲克拉錳稀釋液後，隔週再行噴霧接種黃葉病菌，連續處理 4 次亦無法有效降低病害的發生 (資料未發表)。綜合上述結果，本研究認為在田間防治由鐮胞菌引起的蝴蝶蘭病害時，應先以抑制孢子發芽效果良好的殺菌劑作為預防性的藥劑，當病害發生時，再輔以施用具有菌絲抑制效果的殺菌劑作為治療性藥劑，如此才能有效防治病害的發生。惟本項推論尚未試驗證實，值得進一步測試其可能性。

誌謝

本研究承行政院農業委員會動植物防疫檢疫局科技計畫 101 農科 -10.3.1- 檢 -B5 (7) 與農業試驗所科技計畫 101 農科 -10.2.1- 農 -C3 (1) 經費補助，謹致謝忱。

引用文獻

Chen, Y., A. F. Zhang, T. C. Gao, Y. Zhang, W. X. Wang, K. J. Ding, L. Chen, Z. Sun, X. Z. Fang, and M. G. Zhou. 2012. Integrated use of pyraclostrobin and epoxiconazole for the control of Fusarium head blight of wheat in Anhui Province of China. Plant Dis. 96:1495–1500.

Customs Administration, Trade Statistics, Customs Administration, Ministry of Finance. n.d. Value of exports and imports. http://www.customs.gov.tw/StatisticsWebEN/IESearch.aspx?Type=Edit&Code=0602909911 (visit on 1/4/2013)

Dam, S. K., S. Dutta, S. K. Laha, S. Roy, and P. M. Bhattacharya. 2010. Effect of fungicides for management of brown spot disease of *Motihari* tobacco. J. Mycopathol. Res. 48:221–225.

Ellis, M. L., K. D. Broders, P. A. Paul, and A. E. Dorrance. 2011. Infection of soybean seed by *Fusarium graminearum* and effect of seed treatments on disease under controlled conditions. Plant Dis. 95:401–407.

Hibar, K., M. Daami-Remadi, F. Ayed, and M. El-Mahjoub. 2007. Fusarium crown and root rot of tomato and its chemical control. Intl. J. Agric. Res. 2:687–695.

Ivić, D., Z. Sever, and B. Kuzmanovska. 2011. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum, F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. Pestic. Phytomed. 26:35–42.

Liao, G. J., T. F. Hsieh, and H. R. Chen. 2012. Effect of chemical treatment on prevention of Fusarium yellow of *Phalaenopsis* seedling under simulated conditions of shipment. J. Taiwan Agric. Res. 61:124–131. (in Chinese with English abstract)

Mateo, E. M., F. M. Valle-Algarra, R. Mateo, M. Jiménez, and N. Magan. 2011. Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium. Intl. J. Food Microbiol. 151:289–298.

Meena, M. L. and R. P. Maharshi. 2013. Management of *Alternaria alternata* and *Fusarium semitectum* of Isabgol through Fungicides. Ann. Agric. Bio. Res. 18:238–242.

Naik, M. K., H. D. Angadi, G. S. Devikarani, and M. G. Patil. 2008. Evaluation of chilli (*Capsicum annuum* L.) genotypes, fungicides and plant products for management of anthracnose disease. J. Mycopathol. Res. 46:213–219.

Omar, I., T. M. O'Neill, and S. Rossall. 2006. Biological control of Fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. Plant Pathol. 55:92–99.

Su, J. F., Y. C. Lee, C. W. Chen, J. H. Huang, and T. F. Hsieh. 2012. Field surveys for Fusarium diseases of *Phalaenopsis* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 21:115–130. (in Chinese with English abstract)

Taj, A. and V. B. S. Kumar. 2013. Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi* causing ginger yellows against antagonist and fungicides. Environ. Ecol. 31(2A):663–666.

Tomlin, C. D. S. 2003. The Pesticide Manual (13th). British Crop Protection Council. Hampshire. 1344 pp.

Evaluation of Fungicides for Growth Inhibitions of *Phalaenopsis* Fusarium Pathogen

Jiunn-Feng Su[1], Yi-Ching Lee[2], Lan-Yi Chien[2], and Ting-Fang Hsieh[3,*]

Abstract

Su, J. F., Y. C. Lee, L. Y. Chien, and T. F. Hsieh. 2015. Evaluation of fungicides for growth inhibition of *Phalaenopsis* Fusarium pathogens. J. Taiwan Agric. Res. 64(1):32–44.

Fusarium diseases of *Phalaenopsis*, including yellow leaf caused by *Fusarium solani*, gray spot caused by *Fusarium oxysporum* and black spot caused by *Fusarium proliferatum*, were frequently found in the fields. Sixteen fungicides were selected for evaluating the inhibition effect of conidiospore germination and mycelium growth of these three pathogens. On inhibition of conidiospore germinations, data showed that inhibition rates of *F. solani* and *F. proliferatum* by 10 mg a.i. L^{-1} dilution concentration of 40% iminoctadine triacetate and 23.6% pyraclostrobin were more than 99%. And inhibition rates of *F. oxysporum* by 2.5 mg a.i. L^{-1} dilution concentration of 50% trifloxystrobin and 23.6% pyraclostrobin were more than 82%. On the inhibition of mycelial growth, data showed that the inhibition rates by 5 mg a.i. L^{-1} dilution concentration of 25% prochloraz and 50% prochlorate manganese were more than 60%, better than other tested fungicidies.

Key words: *Phalaenopsis* diseases, Fusarium pathogen, Fungicide.

Received: September 3, 2014; Accepted: November 27, 2014.
* Corresponding author, e-mail: tfhsieh@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Assistants, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow and Director, Floriculture Research Center, Taiwan Agricultural Research Institute, Yunlin, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(1):45–52 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06401.05 研究報告

利用 SSR 標誌進行西瓜雜交種之檢測

王昭月[1] 吳明哲[2,*]

摘要

王昭月、吳明哲。2015。利用 SSR 標誌進行西瓜雜交種之檢測。台灣農業研究 64(1):45–52。

一代雜交種檢測是商業種子生產的重要品管工作，以生育特性 (grow out test; GOT) 作為檢定模式，是目前種苗業界經常使用的方法，但此方式容易受制於氣候環境而呈現較大的變化與誤差；又利用外觀特性的檢定方式，既耗時且需要較大的栽培空間與人力。本研究目的為開發專一性與共顯性分子標誌，應用於西瓜雜交種親本和雜交種之檢測。試驗結果，自 22 個西瓜商業品種篩選組成 24 個核心簡單序列重複 (simple sequence repeat; SSR) 標誌，其中 3 個關鍵性 SSR 標誌，經測試可通用於 2 個外銷採種的西瓜雜交種之檢測。相較於傳統 GOT 檢定需要 2 個月以上的時程，SSR 標誌較方便於早期進行雜交種子遺傳純度檢測之應用。

關鍵詞：西瓜、簡單序列重複、雜交種檢測。

前言

作物品種純度檢測是種子生產流程中品質管控與信譽維護的重要工作。台灣外銷蔬菜一代雜交種子生產種類以葫蘆科作物：西瓜、甜瓜；茄科作物：番茄、番椒；十字花科蔬菜：花椰菜等為最大宗，目前業者主要採用傳統 grow-out test (GOT) 方式，進行品種純度之檢定。此依據外觀性狀的檢查方式，需要較大的栽培空間和人力，檢測時程較長且成本花費相對也較高；又易受季節氣候和環境限制，造成判讀困難或準確性不穩定。近 30 年間，分子生物分析技術進步神速，已建立多種分子標誌，包含蛋白質分子標誌與核酸層次的 DNA 分子標誌等，在農業上可應用分子標誌 (markers) 作為品種鑑定 (Gong & Deng 2010)、種原遺傳歧異度分析 (Mujaju *et al*. 2010)、遺傳純度分析 (Ballester & Vicente 1998; Crockett *et al*. 2000; Liu *et al*. 2007) 以及建構連鎖圖譜輔助選種 (Hashizume *et al*. 1996; McCouch *et al*. 2002)。以 DNA 分子標誌進行遺傳分析具有以下特質：(1) 直接以核酸作為分析樣品，在各個組織、各個發育時期均可檢測，不受季節、環境限制。(2) 分子標誌種類眾多，可提供多標誌之鑑定比對 (Jang *et al*. 2004; Mujaju *et al*. 2010)。(3) 高度多型性的分子標誌，可延伸作為種間或種內種原鑑定之應用 (Wöhrmann & Weising 2011)。(4) 透過共顯性分子標誌 (co-dominance marker)，可鑑別出同質基因型或雜合基因型，特別適合雜交種之鑑定；尤其以 PCR (polymerase chain reaction) 技術為基礎的簡單重複序列 (simple sequence repeat; SSR) 標誌 (Condit & Hubbell 1991; Wang *et al*. 1994; Kumpatla & Mukhopadhyay 2005)，僅需微量 DNA 且分析方法簡便，目前已應用於花椰菜 (Ida *et al*. 2008) 及水稻 (Komori & Nitta 2004) 等作物的 F_1 純度之快速鑑定。

本研究目的係針對台灣重要外銷採種作物西瓜一代雜交種之檢測，期望建立精確、簡便的 DNA 檢測平台，篩選可實務應用且兼具穩定性的分子標誌，提供國內種苗業界進行親本

投稿日期：2014 年 7 月 31 日；接受日期：2014 年 11 月 28 日。
* 通訊作者：wu@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組研究員兼組長。台灣 台中市。

純度檢定，或 F_1 品種純度之快速檢測。藉此開發完成的分子標誌與 DNA 檢定流程，亦可進一步透過產學合作或將相關技術直接轉移至種苗業者，提升台灣蔬菜種苗產業在國際市場之競爭力。

材料與方法

植物材料與 DNA 萃取

22 個西瓜 (*Citrullus lanatus*) 重要商業品種：涵蓋 8 個紅肉大西瓜 (果重 ≥ 7 kg) 品種；14 個中小型西瓜 (果重 3–6 kg) 品種，包含 9 個紅肉品種和 5 個黃肉品種。22 個供試材料的果實特性詳見表 1。上述 22 個樣品分別取葉片 0.2 g，參考 Iqbal *et al*. (1995) 方法進行 genomic DNA 萃取，提取的 DNA 量以 NANODROP 1000 (Thermo Scientific) 測定，選定 OD260/OD280 值 1.7–1.9 者為分析用樣品；DNA 濃度定量為 25 ng μL^{-1}，提供作為 SSR 分析用模板 DNA。另取得 3 家西瓜採種業界 3 個待測試的雜交組合，包括父母本 (DM、DP；YM、YP；MM、MP) 及一代雜交種 (DF、YF、MF) 標準品之 DNA，進行核心 SSR 分子標誌之測試，並建立關鍵性多型性分子標誌。

EST (expressed sequence tag) 之 SSR 序列與引子設計

利用 NCBI GenBank 之西瓜屬 (*Citrullus*) EST 序列資訊庫，以 Simple Sequence Repeat Identification Tool (Temnykh *et al*. 2001) 搜尋完全 SSRs 序列 (perfect simple sequence re-

表 **1.** 提供 SSR 分析的 22 個西瓜樣品及其果實特性。

Table 1. The samples of watermelon and their fruit characteristics used in the simple sequence repeats (SSRs) analysis.

Variety	Fruit weight (kg)	Fruit shape	Fruit color	Flesh color
Golden crown	2.5	Oblong	Yellow	Red
New crown	3	Globe	Light-green rind with bluish black stripes	Red
Showing	2–3	Oblong	Light-green rind with bluish black stripes	Red
Farmers Giant	10–15	Elongated	Light-green rind with netted stripes	Red
New Baby	3–4	Globe	Green rind with bluish black stripes	Orange
iu-Lian	5	Globe	Dark green rind with bluish black stripes	Yellow
Feng-Lan	2.5	Oblong	Light-green rind with bluish black stripes	Orange
Cheng-Lan	3	Oblong	Light-green rind with bluish black stripes	Orange
New Dragon	9–12	Elongated	Light-green rind with bluish black stripes	Red
Yellow Baby	4–5.5	Globe	Green rind with bluish black stripes	Yellow
Charming Belle	2–3	Oblong	Light-green rind with indistinct stripes	Red
Lan-Bao	7	Globe	Dark green rind with bluish black stripes	Red
Hua-Gu-Niang	3–5	Oblong	Light-green rind with indistinct stripes	Red
Tian-Mei-Ren	3–4	Elongated	Green rind with bluish black stripes	Red
Giant Pink Orchind	3–5	Oblong	Light-green rind with indistinct stripes	Red
China Dragon	10–12	Oblong	Green rind with bluish black stripes	Red
Hui-Ling	5	Oblong	Green rind with bluish black stripes	Red
Flower Dragon	10	Globe	Light-green rind with bluish black stripes	Red
Hua-Guang	12–15	Oblong	Light-green rind with bluish black stripes	Red
Shou-Shan	12	Oblong	Dark green rind with bluish black stripes	Red
Diana	3	Elongated	Yellow	Red
La Belle	10	Elongated	Dark-green rind with indistinct stripes	Red

peats)，篩選條件為 2 個核甘苷酸以上的基序 (motif) 且重複次數 5 個以上，取得候選 SSR 序列後涵蓋側翼序列 (flanking sequence)，再利用 primer 3 (Rozen & Skaletsky 2000) 進行引子設計。primer 3 引子設計條件設定為長度 18–20 bp，Tm 60℃ ± 3℃，GC% 為 60% ± 20%；預期 PCR 產物範圍 100–400 bp。

PCR (polymerase chain reaction) 與電泳分析

PCR 反應液體積為 25 µL：包含 DNA 50 ng、1U *Taq* polymerase (Hot Fire, Solis Biodyne)、1× PCR buffer、2.0 mM $MgCl_2$、200 µM dNTP 及引子 0.4 µM，反應引子則利用上述 NCBI 核酸資料庫序列所設計的 SSR 引子組進行之。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9700，反應溫度設定為：95℃、12 min；接續 95℃、1 min，55℃、1 min，72℃、1 min 30 s，35 個循環；最後 72℃、8 min。反應完成後保持於 4℃。

取 PCR 產物 10 µL 加入 6× 電泳追蹤染劑 (6× loading buffer: 0.25% bromophenol blue 及 xylene cyanol, 40% w/v sucrose)，以 3% Agarose SFR 或 Metaphor Agarose 高解析膠體，置於 0.5× TBE buffer (40 mM Tris acetate, pH 8.0; 1 mM EDTA) 進行 DNA 電泳；或以 6% 聚丙醯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)。電泳槽為 BIO-RAD SUB CEL；於 UV 下檢視膠體上多型性之等位基因 (alleles) 片段，並照相、貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation, CA, USA) 系統，反應產物以 Gen 100 DNA ladder marker (GeneMark Technology Co., Taiwan) 計算等位基因片段大小。

核心 SSR 標誌與西瓜雜交種 F_1 之鑑定

22 個西瓜材料，利用已設計的 SSR 引子進行 PCR 擴增與多型性篩檢，選取 PCR 產物範圍與預期大小符合，具多型性且易於判讀之 SSR 基因座，分別紀錄等位基因數量與產物大小。經篩選出的多型性引子組，組成後續雜交種鑑定用核心 SSR 標誌。

以核心 SSR 標誌，進行採種業界提供的 3 個商業雜交種與親本等 DNA 樣品之測試，搜尋在父、母本與 F_1 間具有共顯性表現的特定分子標誌；或只出現於 F_1 而不存在母本之差異性標誌，亦可作為 F_1 品種純度檢定之標誌。綜合各商業雜交種兩次重複測試之結果，選取再現性穩定的標誌，作為共通利用的關鍵性 SSR 標誌。

結果

開發西瓜屬 EST-SSR 標誌

西瓜屬 EST 序列經 Simple Sequence Repeat Identification Tool (SSRIT) 搜尋結果，調整篩選條件為 2 至 6 個重複性核苷酸，且該基序重複次數達 4 個以上的完全 SSRs 序列，並涵蓋適當的側翼序列以設計 SSR 引子，合計取得 283 對候選引子，提供 22 個西瓜商業一代雜交品種之 PCR 分析。經 SSR-PCR 分析結果，篩選出其中 24 對 SSR 引子具有明顯多型性，在 SFR 膠體電泳具有清晰可判讀得多型性產物，組成品種鑑定用核心 SSR 引子組。24 對核心 SSR 引子組，進一步測試採種業界提供的 3 個商業雜交種與親本等 DNA 樣品，結果獲得 7 組適用於其中 2 家業界 2 個採種的雜交種之鑑別 (圖 1、表 2)，其 SSR-PCR 產物範圍為 113–260 bp，等位基因數量為 2–3 個。

進一步分析此 7 組 SSR 基因座之重複基序顯示，有 5 個基因座屬於 3 核苷酸重複基序型，其中 3 個基因座適用於 2 家業界 2 個 F_1 品種 (DF, MF) 之檢定，包含基序同為 $(GCA)_n$ 的 WM224 和 WM227 基因座，以及基序為 $(AGA)_n$ 的 WM330；其餘分別是基序 $(CTT)_n$ 的 WM120，可用以檢測雜交種 MF；以及基序為 $(AAG)_n$ 的 WM381 基因座，可檢測雜交種 DF。另 WM246 基因座為 2 個核苷酸重複基序型 $(AT)_n$，可用以檢測雜交種 MF。而基因座 WM263 則是屬於 6 個核苷酸重複基序型 $(TCGTCT)_4$，可檢測雜交種 DF (表 2)。

關鍵性 SSR 標誌與西瓜雜交種之鑑別

自西瓜屬 EST-SSR 24 對核心引子組，篩選 7 個 SSR 基因座，可延伸利用在 2 家業

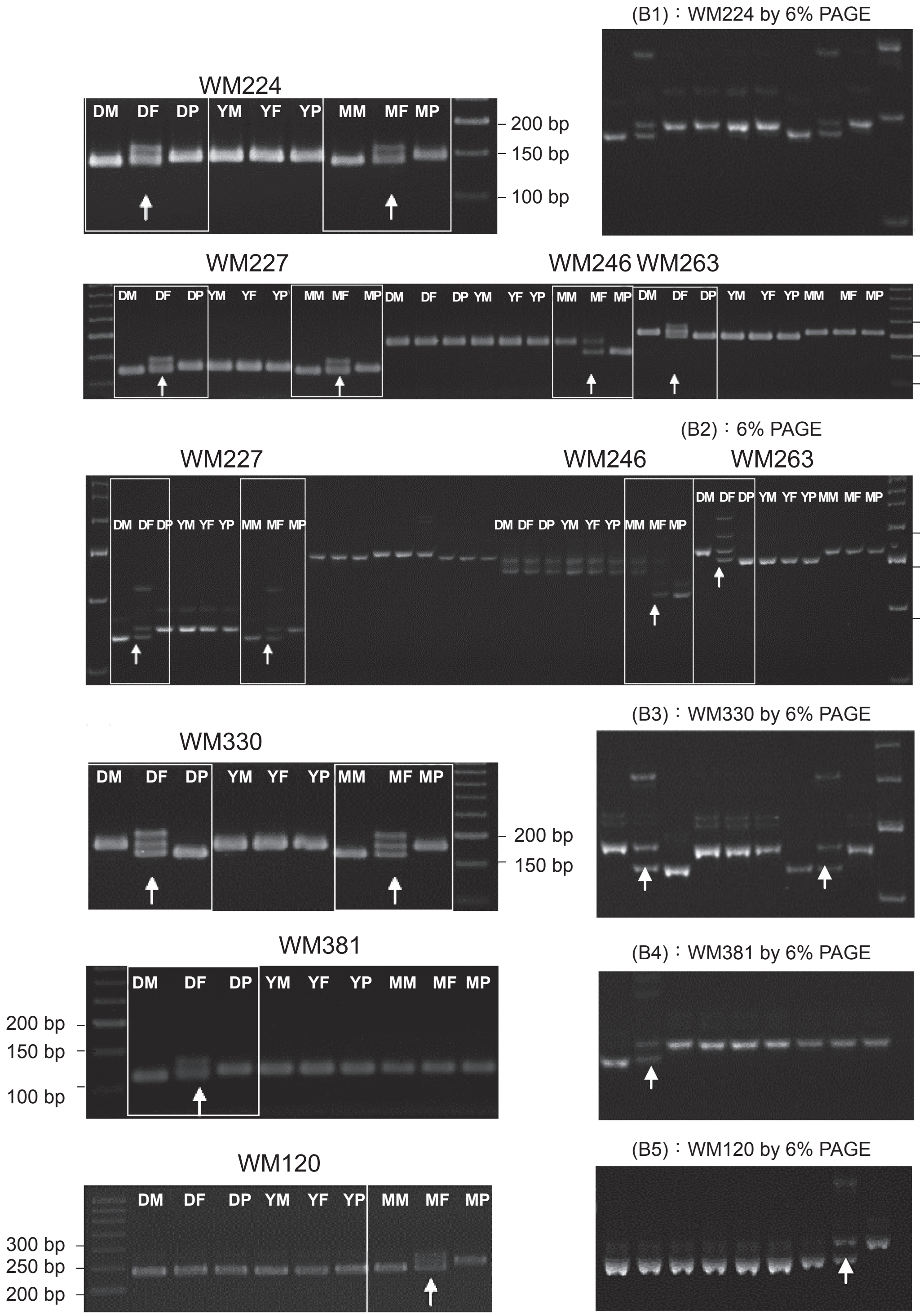

圖 1.　3 個西瓜雜交種和相關親本分別以 7 個 SSR 標誌分析之圖譜。

Fig. 1.　SSR profiles of three watermelon hybrids (DF; YF; MF) and respective parental lines (DM, DP; YM, YP; MM, and MP) obtained from seven informative markers of WM224, WM227, WM246, WM263, WM330, WM381, and WM120.

表 2. 核心 SSR 基因座篩選出重要的微衛星標誌及其 PCR 產物特性。

Table 2. The informative microsatellite markers selected from a core set of SSR loci and their products characteristics.

Locus (GenBank accession no)	Repeat motif	Expected size (bp)	Product size (bp)	Allele no.
WM120 (AI563551)	$(CTT)_{13}$	240	240–255	3
WM224 (GD175992)	$(GCA)_{11}$	147	140–153	3
WM227 (GD176087)	$(GCA)_{11}$	127	127–147	3
WM246 (GD176845)	$(AT)_{9}$	158	158–180	2
WM263 (GD177425)	$(TCGTCT)_{4}$	211	197–225	3
WM330 (GD179345)	$(AGA)_{8}$	164	160–200	3
WM381 (GD180564)	$(AAG)_{12}$	113	113–145	3

界 2 個商業採種之雜交種檢定 (圖 1)。依據解析能力較大的 6% PAGE 分析 (圖 1：B1、B2、B3、B4、B5) 顯示，其中 3 個基因座 (圖 1：B1、B2、B3) 各有 2 個關鍵性的特定等位基因片段，共通適用於 2 個雜交種 DF 與 MF 之鑑定，分別為 $WM224_{(140\ bp、147\ bp)}$、$WM227_{(127\ bp、137\ bp)}$、$WM330_{(165\ bp、184\ bp)}$ (表 3、圖 1)。基因座 WM224 反應產生 3 個等位基因片段 (140 bp、147 bp、190 bp)，其 147 bp 為 DP 與 MP 兩父本特有的片段，兩母本 DM 與 MM 的等位基因片段為 140 bp，2 個雜交種 DF 與 MF 有 3 個等位基因片段分別是 140 bp、147 bp、190 bp (表 3)。另基因座 WM227 產生 3 個等位基因片段 (127 bp、137 bp、165 bp)，其中 137 bp 為兩父本 (DP 與 MP) 特有的片段，兩母本 (DM 與 MM) 的等位基因片段為 127 bp，2 個雜交種 (DF 與 MF) 有 3 個等位基因片段分別是 127 bp、137 bp、165 bp (表 3)。基因座 WM330 可產生 3 個等位基因片段 (165 bp、184 bp、255 bp)，其 165 bp 為 DP 與 MM 父、母本共有的片段，184 bp 為 MP 與 DM 父、母本共有的片段，而 2 個雜交種 (DF 與 MF) 有 3 個等位基因片段分別是 165 bp、184 bp、255 bp (表 3)。

討論

栽培種西瓜之染色體組 2n = 2x = 22，基因組大小約 8.5×10^{8} bp (Guo *et al*. 2013)。早期 Levi *et al*. (2001) 曾以 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 標誌建構其遺傳連鎖圖譜，篩選出與 Fusarium wilt 抗病性相關之特定 RAPD 片段，進而轉換成輔助選種的 SCAR (sequence characterized amplified region) 標誌。Hashizume *et al*. (2003) 則利用西瓜 BC_1 與 F_2 族群，以 RAPD、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 與 ISSR (inter-simple sequence repeat) 等標誌，建構遺傳連鎖圖譜並進行 QTL 分析，進而發現與

表 3. 篩選出 3 個 SSR 基因座用以鑑別 2 個雜交種與親本及其擴增的等位基因片段。

Table 3. Allelic sizes of amplification with three selected SSR loci for two hybrids identification and their corresponding parental lines in watermelon.

	Specific alleles (bp) in the selected SSR locus		
Hybrids and their parents	WM224 (GD175992)	WM227 (GD176087)	WM330 (GD179345)
DM	140	127	184
DF	140, 147, 190	127, 137, 165	165, 184, 255
DP	147	137	165
MM	140	127	165
MF	140, 147, 190	127, 137, 165	165, 184, 255
MP	147	137	184

西瓜果皮顏色、果皮硬度、果肉色與糖度等相關連之分子標誌。至 2010 年以後，高訊息的 SSR 標誌陸續應用於西瓜品種鑑定與種原之遺傳分析 (Nantoume *et al*. 2013)。

鑑於 SSR 存在植物基因組的豐富性與多型性，對於已經解序或尚未完成解序的作物而言，均可利用此標誌進行遺傳分析，或作為指紋分析之利器。本研究自 NCBI GenBank 之西瓜屬，取得近 2,000 個 EST 核酸序列，進行 microsatellite repeats 搜尋及 SSR 引子設計，初步取得 283 對 SSR 候選引子，其 EST-SSR 引子可設計率約 14% (數據未附於本文)，此相近於 Wöhrmann & Weising (2011) 前人研究結果，唯番茄作物上 EST-SSR 引子之可設計率為 28% (He *et al*. 2003)，故推測 EST-SSR 引子的可設計率，可能依作物基因組而異，但利用 EST 開發可利用的 SSR 標誌，仍是可行的途徑。

又依據前人對植物基因組的 SSR 基序分析結果，以 2 或 3 個核苷酸序列重複較為普遍，但不同物種間重複性基序種類有所差異 (Condit & Hubbell 1991; Wang *et al*. 1994; Kalia *et al*. 2011)，如番茄作物上以 AT/TA repeat 頻度最高 (He *et al*. 2003)；西瓜、非洲菊 (*Gerbera hybrida*) 或鳳梨作物則以 $(GA)_n$ 出現頻度最高 (Levi *et al*. 2002; Gong & Deng 2010; Wöhrmann & Weising 2011)。歸納本研究中，針對西瓜雜交種鑑別而篩選出 10 個重要 SSR 標誌發現，以 3 個核苷酸序列重複比率較高，約占 6 成之多，其中又以 $(GCA)_n$ 出現的頻度最高 (表 2)，可符合前人基因組研究與分析結果。唯 3 個核苷酸序列重複基序，其 PCR 產生的多型性片段差異性較大於 2 個核苷酸序列重複基序的產物，故可判讀性也較高；若搭配電泳解析能力較大的 PAGE 系統，較方便於分子量差距為 7–10 bp 的共顯性等位基因片段之判讀 (圖 1)。另本研究中 Y 公司提供的 3 個測試品 (YM, YF, YP)，經兩次重複測試結果，均未取得該雜交種與兩親本間的多型性片段；經洽詢提供者是否可再次予以取樣，業者表示已停止該項目之採種，故未能再進一步之測試。

綜合 22 個西瓜商業一代雜交種之 SSR-PCR 分析結果，以及後續應用於 2 個 F_1 採種的雜交種檢測之結果顯示，關鍵性微衛星 (microsatellite) DNA 標誌之開發，可有效應用於品種遺傳純度之快速檢測。而未來透過已解序的西瓜基因組之核酸資料庫，將可開發出更多有用的 SSR 標誌，除利用於種原材料之遺傳歧異度評估外，亦可藉此分子標誌輔助育種選拔 (marker-assisted selection; MAS)，加速優良新品種之選育，以延續台灣西瓜品種在國際市場之領先地位。

誌謝

本研究承蒙農委會農糧領域科技計畫 (99 農科 -1.1.1- 農 -C5；100 農科 -1.1.1- 農 -C2 & C5) 經費補助，謹此致謝。

引用文獻

Ballester, J. and M. C. de Vicente. 1998. Determination of F_1 hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. Euphytica 103:223–226.

Condit, R. and S. P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. Genome 34:66–71.

Crockett, P. A., P. L. Bhalla, C. K. Lee, and M. B. Singh. 2000. RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea var*. capitata) cultivar. Genome 43:317–321.

Gong, L. and Z. Deng. 2010. EST-SSR markers for gerbera (*Gerbera hybrida*). Mol. Breed. 26:125–132.

Guo, S., J. Zhang, H. Sun, J. Salse, W. J. Lucas, H. Zhang, Y. Zheng, L. Mao, Y. Ren, Z. Wang, J. Min, X. Guo, F. Murat, B. K. Ham, Z. Zhang, S. Gao, M. Huang, Y. Xu, S. Zhong, A. Bombarely, L. A. Mueller, H. Zhao, H. He, Y. Zhang, Z. Zhang, S. Huang, T. Tan, E. Pang, K. Lin, Q. Hu, H. Kuang, P. Ni, B. Wang, J. Liu, Q. Kou, W. Hou, X. Zou, J. Jiang, G. Gong, K. Klee, H. Schoof, Y. Huang, X. Hu, S. Dong, D. Liang, J. Wang, K. Wu, Y. Xia, X. Zhao, Z. Zheng, M. Xing, X. Liang, B. Huang, T. Lv, J. Wang, Y. Yin, H. Yi, R. Li, M. Wu, A. Levi, X. Zhang, J. J. Giovannoni, J. Wang, Y. Li, Z. Fei, and Y. Xu. 2013. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. Nature Genet. 45:51–58.

Hashizume, T., I. Shimamoto, and M. Hirai. 2003. Construction of a linkage map and QTL analysis of

horticultural traits for watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] using RAPD, RFLP and ISSR markers. Theor. Appl. Genet. 106:779–785.

Hashizume, T., I. Shimamoto, Y. Harushima, M. Yui, T. Sato, T. Imai, and M. Hirai. 1996. Construction of a linkage map for watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Euphytica 90:265–273.

He, C., V. Poysa, and K. Yu. 2003. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. Theor. Appl. Genet. 106:363–373.

Ida, A. A., J. A. Plummer, R. A. Lancaster, and G. Yan. 2008. Identification of 'Sib' plants in hybrid cauliflowers using microsatellite markers. Euphytica 164:309–316.

Iqbal, M. J., D. W. Paden, and A. L. Rayburn. 1995. Assessment of genetic relationships among rhododendron species, varieties and hybrids by RAPD analysis. Sci. Hort. 63:215–223.

Jang, I., J. H. Moon, J. B. Yoon, J. H. Yoo, T. J. Yang, Y. J. Kim, and H. G. Park. 2004. Application of RAPD and SCAR markers for purity testing of F_1 hybrid seed in chili pepper (*Capsicum annuum*). Mol. Cells 18:295–299.

Kalia, R. K., M. K. Rai, S. Kalia, R. Singh, and A. K Dhawan. 2011. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. Euphytica 177:309 –334.

Komori, T. and N. Nitta. 2004. A simple method to control the seed purity of japonica hybrid rice varieties using PCR-based markers. Plant Breed. 123:549–553.

Kumpatla, S. P. and S. Mukhopadhyay. 2005. Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species. Genome 48:985–998.

Levi, A., C. E. Thomas, T. Joobeur, X. Zhang, and A. Davis. 2002. A genetic linkage map for watermelon derivedfrom a testcross population: (*Citrullus lanatus* var. citroides × *C. lanatus* var. lanatus) × *Citrullus colocynthis*. Theor. Appl. Genet. 105:555–563.

Levi, A, C. E. Thomas, X. Zhang, T. Joobeur, R. A. Dean, T. C. Wehner, and B. R. Carle. 2001. A genetic linkage map for watermelon based on Randomly Amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126:730–737.

Liu, L. W., Y. Wang, Y. Q. Gong, T. M. Zhao, G. Liu, X. Y. Li, and F. M. Yu. 2007. Assessment of genetic purity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) hybrid using molecular markers. Sci. Hort. 115:7–12.

McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). DNA Res. 9:199–207.

Mujaju, C., J. Sehic, G. Werlemark, L. Garkava-Gustavsson, M. Fatih, and H. Nybom. 2010. Genetic diversity in watermelon (*Citrullus lanatus*) landraces from Zimbabwe revealed by RAPD and SSR markers. Hereditas 147:142–153.

Nantoume, A. D., S. B. Andersen, and B. D. Jensen. 2013. Genetic differentiation of watermelon landrace types in Mali revealed by microsatellite (SSR) markers. Genet. Resour. Crop Evol. 60:2129–2141.

Rozen, S. and H. J. Skaletsky. 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. p.365–386. *in*: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. (Krawetz, S. and S. Misener, eds.) Humana Press. Totowa. 500 pp.

Temnykh, S., G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour, and S. McCouch. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Res. 11:1441–1452

Wang, Z., J. L. Weber, G. Zhong, and S. D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88:1–6.

Wöhrmann, T. and K. Weising. 2011. In silico mining for simple sequence repeat loci in a pineapple expressed sequence tag database and cross-species amplification of EST-SSR markers across *Bromeliaceae*. Theor. Appl. Genet. 123:635–647.

Identification of F_1 Hybrids in Watermelon Using SSR Markers

Jau-Yueh Wang[1] and Min-Tze Wu[2,*]

Abstract

Wang, J. Y. and M. T. Wu. 2015. Identification of F_1 hybrids in watermelon using SSR markers. J. Taiwan Agric. Res. 64(1):45–52.

Determination of F_1 hybrids and their corresponding parental lines is an important quality control in the production of hybrid vegetable seeds. The grow-out trial (or grow out test; GOT) is a commonly used method for genetic purity test by seed enterprise. The trial consists of a number of morphological characters that can vary according to environmental conditions. Furthermore, checking these types of trials are time consuming, space demanding, and often do not allow the unequivocal identification of the genotypes. The objectives of this study were to generate the specific and co-dominant markers for discrimination parental lines and the subsequent assessment of hybrids in watermelon. Genomic DNA from the three F_1 hybrid cultivars and their parental lines were screened with 24 polymorphic core SSR (simple sequence repeat) primer pairs that developed from 22 commercial varieties. Based on the results, a key set of three SSR markers were selected for hybrid identification. As the validation time of GOT's method could be more than two months, SSR analysis would be a useful tool for early testing the genetic purity in commercial hybrid seeds production.

Key words: *Citrullus lanatus*, Simple sequence repeat, Hybrids identification.

Received: July 31, 2014; Accepted: November 28, 2014.

* Corresponding author, e-mail: wu@tari.gov.tw

1 Assistant Rsearch Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

2 Research Fellow and Director, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(1):53–63 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06401.06 研究報告

生化及化學法聯檢之農藥殘留管理研究：北市模式

鄭允[1] 黃毓斌[2] 江明耀[2,*] 侯怡亘[3] 粘君綺[3]

摘要

鄭允、黃毓斌、江明耀、侯怡亘、粘君綺。2015。生化及化學法聯檢之農藥殘留管理研究：北市模式。台灣農業研究 64(1):53–63。

台灣農產運銷系統自 1985 年開始，採用以乙醯膽鹼酯酶檢定毒性之生化方法管制有機磷及氨基甲酸鹽類農藥殘留。至 2014 年止，已輔導設置逾 380 處工作站，每年檢測 78 萬件以上蔬果樣本。其中，以台北市政府建構之聯檢制度最為完善，以酵素抑制率 45% 為標準，超標蔬果立即停止拍賣並銷毀，同時採樣送交衛生局以化學分析法鑑定殘留農藥之種類及濃度，若違反農藥殘留容許量規定則依食品衛生管理法之規定進行處罰。本研究乃就 2009–2012 年間該公司以生化法檢出 554 件陽性樣本之產地資訊及衛生局之化學分析結果進行解析，結果如下：554 件超標樣本平均每件含農藥 3.31 種，平均合計濃度為 1.91 mg L^{-1}，其中殺蟲劑與殺菌劑之比例為 2 : 1。就有機磷及氨基甲酸鹽類農藥，合計檢出率為 95.1%，平均每件樣本檢出 1.4 種。此指數大於 1，因毒理作用相同而有累加問題，僅依據個別藥劑之容許量判定，會低估合計之總毒性。其中，經化學分析確認超過國家容許量標準，而違反食品衛生管理法者計 259 件，平均每件含 4.1 種農藥，合計濃度為 3.2 mg L^{-1}，所含有機磷及氨基甲酸鹽類合計達每件 1.8 種，平均濃度為 1.4 mg L^{-1}。檢出殺蟲劑以有機磷最多佔 47.5%，依序為合成除蟲菊精佔 19.4%、氨基甲酸鹽類佔 17.2%、新尼古丁佔 15.9%。抗膽鹼酯農藥中檢出頻度之高低，依序為陶斯松 (53.3%)、佈飛松 (23.8%)、加保扶 (19.5%)、納乃得 (9.6%)、毆殺滅 (5.6%)、毆殺松 (5.4%)、達馬松 (4.5%)、愛殺松 (4.0%)、益滅松 (2.2%) 及加保利 (1.8%)。在 500 餘處蔬果生產供貨組織中，超標及違規之前 10 處供貨單位即佔生化法超標總件數之 45.9%，以及違規總件數之 41.7%，其中 6 處位於雲林縣，均生產小葉菜類；另外 3 處位在彰化縣，以生產甘藍芽、茄子及豆類為主；最後 1 處在嘉義縣，亦為小葉菜類產區。其各種藥劑殘留模式與產地及菜種有相當之關係。迄今國際上蔬果農藥殘留管制仍缺乏產地源頭管理之預警系統，因本研究之四年分年資訊有重現性，若試以此等資料之分析結果發展預警系統，監控高風險產地，將有助於減少蔬果之農藥殘留。

關鍵詞：農藥、殘留量、蔬果、乙醯膽鹼酯酶。

前言

食品安全中最受關注的莫過於蔬果農藥殘毒問題，農藥的殘留受諸多因素影響，如作物類別、病蟲害多寡、農藥理化性質、用藥習性及天候等。此一問題不易由模擬或試驗方式推論，應檢測上市蔬果之樣本較為落實。雖然政府行政系統有常態性監測 (Tseng *et al*. 2013) 及田間監測工作，但每年檢測件數僅約 2 萬件，但其樣品來源屬逢機抽查性質，難就所得結果進行系統性解析與闡述，不但無從歸納蔬

投稿日期：2014 年 9 月 12 日；接受日期：2014 年 11 月 28 日。
* 通訊作者：mingyaw@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所應用動物組前研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所應用動物組研究助理。台灣 台中市。

果農藥殘留問題特質，亦無法引申出有效解決對策[1]。

目前，衛生單位依「食品衛生管理法」[2] 標準程序作業，時效上無法攔截殘毒違規蔬果上市，難以達到該法原意保護國民健康之初衷。為此，農業試驗所開發以乙醯膽鹼酯酶 (acetylcholinesterase; AChE) 檢測有機磷 (organophosphate) 及氨基甲酸鹽類 (carbamate) 兩大類神經毒農藥 (Anonymous 1980; US EPA 2000) 的生化檢驗技術 (Chiu *et al*. 1991)，供快速篩檢上市蔬果之用。自 1985 年起，產地及批發市場逐漸採用，台北市更由衛生局會同台北農產運銷公司及相關局處進行生化與化學兩種檢驗併行之聯檢制度，即先於市場進行生化快篩攔截農藥殘毒超標 (enzyme inhibition positive; EIP) 蔬果，再取樣由衛生局以化學法複驗後，依「安全容許量」標準判定是否違規 (tolerance-violation; TV)[3]。該局曾於 1993–1994 年間評估兩項檢驗技術間之異同及風險，發現酵素抑制率達 45% 以上時約有六成 (61%) 樣本違反「安全容許量」標準，而據此一相關性，訂定為生化快篩之「超標標準」[4]，實施迄今已 20 年。近年來，農委會公告禁用多種劇毒農藥，也增加登記多種安全性較高的新型農藥，如新尼古丁等 (Liao 2005)，因此宜再行評估生化檢驗之取締標準。此外，亦應就蔬果殘留農藥之現況進行瞭解，以冀能尋求防阻對策。

本研究針對聯檢系統檢出之殘留抗膽鹼 (Anticholinergic) 劇毒農藥[5] 的生化檢驗「超標樣本」進行評估，以共同運銷至台北農產運銷公司的農產品為取樣範圍，超標樣本所含農藥，以衛生局及農業試驗所之分析結果為依據，進行下列項目之解析：(1)「生化檢驗」超標樣本含抗膽鹼農藥之確認。(2) 超標樣本農藥殘留之「數」與「量」。(3) 超標樣本之「容許量違規區分」及其農藥殘留內容。(4) 檢出農藥之用途區分。(5) 檢出殺蟲劑之化學區分。(6) 混用農藥及累加毒性 (Common Mechanism Group; CMG)[6] 問題。(7) 目標農藥檢出頻度比較。(8) 超標及違規產地檢出頻度比較。

本研究著重資料之重現性，故以 2009–2012 連續四年之樣本進行解析及比較。

材料與方法

本研究之樣品取樣地點為台北農產運銷股份有限公司，其市場交易規模佔台灣全島消費量之 15–20%，2009–2012 連續四年之年平均交易量為蔬菜 465,616 Mg 以及水果 211,980 Mg，合計 677,596 Mg，蔬果之日平均交易量為 1,856 Mg，貨源來自全島各地[7]。取樣分析對象以台灣本地生產之蔬果為範圍，進口蔬果部分屬輸入邊境管制，資料未納入分析。樣品抽樣原則依蔬果種類及產地來源單位採用滾動式抽樣，確保各項蔬果及各供貨單位均有大致相同的抽樣機率，避免偏重少數品項或供貨單位，每日抽樣約 150–180 件進行農藥殘毒生化檢驗篩檢。經分析 2009–2012 連續四年之資料，期間共計檢驗 223,135 件，年平均抽檢 55,784 件。

農藥殘毒生化檢驗係以行政院農委會農業試驗所利用農藥敏感品系家蠅 (*Musca domestica* L.) 頭部製備之乙醯膽鹼酯酶進行樣本萃取液之 *Ellman's test* (Ellman *et al*. 1961; Bergmeyer *et al*. 1984) 檢測，並依台北市聯檢小組訂定之 45% 酵素抑制率「超標標準」進行篩檢，4 年中共篩檢出毒性超標樣本 554 件。

---

[1] 監察院財政及經濟委員會糾正行政院農業委會、衛生署及經濟部標準檢驗局有關農藥管理及蔬果查驗案全文。2001。及監察院財政及經濟委員會調查高雄果菜運銷公司檢驗蔬果農藥殘留量流程出現嚴重疏失案之調查意見及糾正案全文。2004。

[2] 行政院衛生署。2002。食品衛生管理法。

[3] 台北市政府查驗蔬果殘留農藥聯合執行小組第 12 次會議紀錄。1994。

[4] 台北市政府查驗蔬果殘留農藥聯合執行小組第 14 次會議紀錄。1996。

[5] 行政院衛生署及榮民總醫院臨床毒藥物防治諮詢中心編撰之「常見毒藥物中毒急診手冊」對毒性物質之說明。1985。

[6] US EPA. 2002. Guidance on cumulative risk assessments of pesticide chemicals that have a common mechanism of toxicity. & US EPA. 2002. Response to public comments on office of pesticide program's guidance on cumulative risk assessments of pesticide chemicals that have a common mechanism of toxicity.

[7] 台北農產運銷公司年報。

超標樣本分別送樣至台北市衛生局進行化學複驗，採用「食品中殘留農藥檢驗方法-多重殘留分析方法」[8] 分析樣品所含各類農藥及殘留量；及農業試驗所以 TLC/酵素呈色法 (Stahl 1967)，檢測水溶性抗膽鹼農藥之殘留。「超標樣本」之農藥分析內容、日期、菜種、批號、重量及產地來源等資訊均依台北農產運銷公司列案管理之內容考證。

結果

乙醯膽鹼酯酶篩檢呈陽性反應之樣本，理應含有機磷或氨基甲酸鹽兩類抗膽鹼目標農藥的殘留。本研究中 554 件「超標樣本」中，經衛生局以 GC/MS、HPLC、LC/MS/MS 等方法檢出 451 件 (81.4%) 含「偏脂溶性」之目標農藥，農業試驗所以 TLC/AChE 方法檢出 76 件 (13.7%) 含「偏水溶性」目標農藥如覆滅蟎 (Formetanate) 等，兩者合計 527 件，確認含抗膽鹼農藥者達 95.1% (表 1)。因此生化檢驗「超標樣本」均能以多種化學分析方法鑑定其毒性來源，4 年之農藥殘毒複驗確認率為 90.7–98.7%。

有關「超標樣本」農藥殘留之「數」與「量」關係分析，鑑於早期衛生署對食品中之農藥殘留有總量管制，若同一樣本中檢出 2 種農藥，則檢出藥劑之原有容許量需除以 2 來計算，若檢出 2 種以上農藥時，則依此類推，後來該署取消此項規定，然而殘留農藥之「數」與「量」，對消費者健康之影響均是負面的，理應加以管理，本研究分析樣本檢驗結果所得到殘留農藥之「數」與「量」關係簡述如下：(1) 554 件「超標樣本」共檢出 1,833 次農藥，個別樣品檢出農藥數之頻度如圖 1，平均每件樣本含藥數為 3.30 種，證實農民混用多種藥劑之習性，四年之範圍為 2.74–3.75 種，標準誤差為 ± 0.47 (表 2)，分年度之結果相似。(2) 雖然農藥殘留量是依「容許量」分項計算，但 554 件樣本均呈現混用多種農藥之狀況，不同藥劑之殘留總量亦不容忽視，過去曾經依檢出農藥之數目進行總量管制，而今雖無此項措施，但問題仍舊存在，尤其部分農藥更涉及 CMG 問題。為提供個別樣品殘留農藥總量之簡易比較方法，參考慣用於鹽滷中含不同化學成分鹽類之總和濃度 (salinity) 計算方式，合併估算殘留農藥濃度 (pesticide titre)。依此方式估算，樣本中檢出之農藥殘留總量，每件之平均農藥濃度為 1.91 mg L^{-1}，四個年度之結果落在 1.65–2.15 mg L^{-1} 之範圍，標準誤差為 ± 0.23 mg L^{-1} (表 2) ，分年差異不顯著。

「超標樣本」之容許量違規區分及其農藥殘留內容分析結果顯示，衛生局以化學分析判定 259 件違反農藥殘留容許量規定，佔總數之 46.9%，四個年度之範圍為 39.7–59.1%，標準誤差為 ± 9.0% (表 3)，各年間之差異不顯著。再就 259 件「違規樣本」(tolerance-violation of enzyme inhibition positive; TVEIP) 與另 295 件「超標未違規」(non-violation of enzyme inhibition positive; NVEIP) 樣本之農藥殘留

表 1. 「超標樣本」含抗膽鹼酯農藥之確認率。
Table 1. The anticholinergic pesticides confirmation rates in the enzyme inhibition positive (EIP) samples.

Year	No. of EIP samples	Anticholinergic pesticides confirmation rate	
		HPLC + GC/MS	HPLC + GC/MS + TLC
2009	136	108 (79.4%)	128 (94.1%)
2010	132	110 (83.3%)	128 (97.0%)
2011	139	103 (74.1%)	126 (90.7%)
2012	147	130 (88.4%)	145 (98.6%)
Total	554	451 (81.3% ± 6.1%)	527 (95.1% ± 3.5%)

[8] 衛生署。2012。署授食字第 1011902143 號公告修正。食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法 (三)。

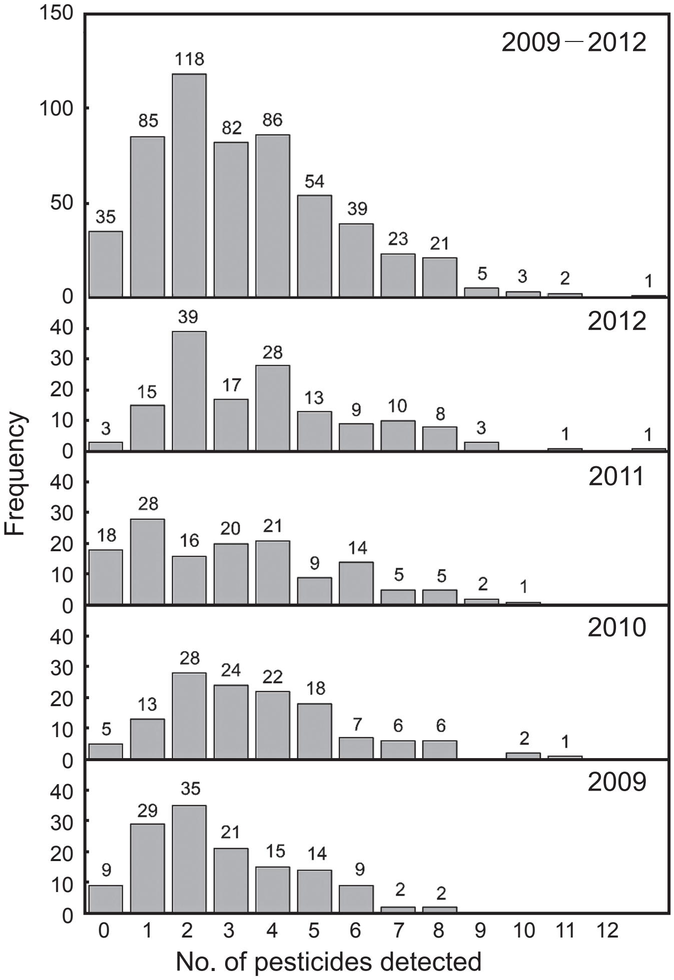

圖 1. 超標樣本含農藥種數頻度分佈圖。

Fig. 1. The frequency distribution of number of pesticides detected in 554 EIP-samples.

表 2. 「超標樣本」之農藥殘留「數」與「量」。

Table 2. The pesticides and their titers in the EIP samples.

Year	No. of EIP samples	Average number of pesticides per sample	Average titer per sample (mg L^{-1})
2009	136	2.74	1.65
2010	132	3.64	2.15
2011	139	3.09	1.81
2012	147	3.75	2.04
Total	554	3.30 ± 0.47	1.91 ± 0.23

概況進行比較，「違規樣本」之平均含藥數為 4.11 種 (四年之範圍為 3.24–4.65，標準誤差為 ± 0.62) 高於「未違規樣本」之 2.54 種 (四年之範圍為 2.33–2.97，標準誤差為 ± 0.29)。而「違規樣本」之農藥濃度為 3.15 mg L^{-1} (四年之範圍為 2.81–3.47 mg L^{-1}，標準誤差為 ± 0.28 mg L^{-1})，

表 3. 超標樣本中「違規樣本」與「未違規樣本」之農藥「數」與「量」。

Table 3. The pesticides and their titers in the tolerance-violation (TV) vs. non-violation (NV) EIP samples.

Year	No. of samples	Average number of pesticides per sample	Average titer per sample (mg L^{-1})
TVEIP			
2009	54 (39.7%)	3.24	2.81
2010	78 (59.1%)	4.45	3.25
2011	59 (42.5%)	4.12	3.09
2012	68 (46.3%)	4.65	3.47
Total	259 (46.9% ± 8.6%)	4.11 ± 0.62	3.15 ± 0.28
NVEIP			
2009	82 (60.3%)	2.41	0.88
2010	54 (41.0%)	2.46	0.56
2011	80 (57.6%)	2.33	0.86
2012	79 (53.7%)	2.97	0.81
Total	295 (53.1% ± 8.6%)	2.54 ± 0.29	0.78 ± 0.15

高過「未違規樣本」之 0.78 mg L^{-1} (四年之範圍為0.56–0.88 mg L^{-1}，標準誤差為 ± 0.15 mg L^{-1})，以上資料之分年差異均不顯著。

檢出之農藥，依農藥使用之目的可區分為殺蟲劑、殺菌劑及其他等三類，依檢出頻度計算，殺蟲劑為 67.1%、殺菌劑為 30.3%，另有生長調節劑與除草劑等其他用途者為 2.6% (表 4)，四年之分年檢出比率差異不顯著。

檢出殺蟲劑之種類，依農藥有效成分分類，主要屬有機磷、氨基甲酸鹽、合成除蟲菊精及新尼古丁等四類化學結構 (表 5)，總計檢出 1,229 次，其中有機磷為 47.5%、氨基甲酸

表 4. 檢出農藥之用途區分比率。

Table 4. Detected frequencies of pesticides in the EIP samples classified by the purpose of application.

Year	Total detected frequency	Classes of pesticide		
		Insecticide	Fungicide	Other
2009	373	256 (68.6%)	117 (31.4%)	0 (0.0%)
2010	480	310 (64.6%)	166 (34.6%)	4 (0.8%)
2011	429	284 (66.2%)	122 (28.4%)	23 (5.4%)
2012	551	379 (68.8%)	151 (27.4%)	21 (3.8%)
Total	1,833	1,229 (67.1% ± 2%)	556 (30.3% ± 3.2%)	48 (2.6% ± 2.5%)

表 5. 「超標樣本」中，不同化學類別殺蟲劑之檢出率。

Table 5. Detected frequencies of insecticides in the EIP samples, classified by their chemical natures.

Year	Detected frequency	Organic phosphorus	Carbamate	Synthetic pyrethrin	Nicotine
2009	256	123 (48.1%)	56 (21.9%)	53 (20.7%)	24 (9.4%)
2010	310	140 (45.2%)	57 (18.4%)	54 (17.4%)	59 (19.0%)
2011	284	137 (48.2%)	41 (14.4%)	60 (21.1%)	46 (16.2%)
2012	379	184 (48.6%)	54 (14.3%)	69 (18.2%)	72 (19.0%)
Total	1,229	584 (47.5% ± 1.6%)	208 (17.2% ± 3.6%)	236 (19.4% ± 1.8%)	201 (15.9% ± 4.5%)

鹽為 17.2%，兩者合計 792 次佔 64.7%。

就毒理作用機制相同之抗膽鹼農藥而言，554 件「超標樣本」平均每件樣品檢出 1.4 種，合計濃度為 0.8 mg L^{-1}，而在 259 件違規樣本中檢出 468 次，平均每件含 1.8 種，合計濃度為 1.4 mg L^{-1}，已造成「藥不同，但毒理相同」之 CMG 問題，合成除蟲菊精及新尼古丁之檢出頻率在每件樣本中約 0.5 次，較不具有 CMG 問題。各類殺蟲劑之分年度檢出比率差異不顯著。

針對混用農藥及累加毒性問題，經統計檢出農藥種類及檢出量，多數「超標樣本」檢出之農藥均超過 1 種 (圖 1)，最多者達 13 種，合計濃度最高者達 36.2 mg L^{-1}。除 CMG 外，即使是不同毒理作用之農藥，其間是否有「累加」、「協力」或「拮抗」等作用，亦無法得知。「容許量」是依單一農藥所訂定，無法判定多種作用相同農藥，殘留在同一樣本中之累加毒性。本次檢出樣本中普遍存在CMG問題，並且是毒性最高的有機磷及氨基甲酸鹽類，兩者均抑制負責神經傳導作用的 AChE。雖然近年來政府以禁用的方式，減少有機磷及氨基甲酸鹽類的使用，但調查資料 (表 5、表 6) 顯示有機磷及氨基甲酸鹽類仍約佔檢出殺蟲劑的 2/3，且四年之檢出資料顯示沒有逐年下降的趨勢，顯然，同類作用機制藥劑之「市場替代性」會降低禁用成效。

由於本研究之重點在抗膽鹼劇毒農藥，有 95% 以上樣本所含目標農藥均經確認。且依檢出頻度之高低表列如表 6，陶斯松檢出頻度最多為 295 次，佔 554 件「超標樣本」之 53.3%，其次為佈飛松之 132 次為 23.8%、而再次者加保扶之 108 次為 19.5%，檢出機率低於 10% 而高於 5% 者依序為納乃得、歐殺滅及歐殺松，低於 5% 者則為達馬松及愛殺松等共 8 種，四年中各單項農藥檢出率之高低亦穩定無變化，由此可見農民選藥具有習慣性。

在超標及違規產地檢出頻度比較結果，四年中全部 500 餘處生產供貨產地中有十處產地達超標 254 次 (表 7)，佔全部「超標樣本」之 45.9%，該十處產地之「容許量違規」108 件亦佔全部「違規樣本」之 41.7%，此十處產地之超標與違規樣本間具有線性關係 (圖 2，R^2 = 0.752)。可見 2% 之高風險產地即可造成約 40% 的農藥殘留問題。再比較此十處產地檢出之「超標樣本」菜種 (表 7) 及農藥 (圖 3)，其中雲林縣排名一至五的五處產地均生產小葉菜，且其地理位置均位於相鄰 (圖 4)，各類農藥殘留之頻度幾乎完全相同，為同一用藥模式，鄰近之第九名產地同為小葉菜產地，用藥亦類似，唯有以加保扶取代陶斯松的情形。彰化縣之「超標樣本」以甘藍芽為主，其用藥類似小葉菜類，但用藥模式與雲林縣因地緣不同而有所區隔，未見使用佈飛松，但陶斯松同為

表 6. 「超標樣本」之單項抗膽鹼農藥檢出頻度比較。

Table 6. Detected frequencies of individual anticholinergic insecticides in the EIP samples.

	Detected frequency				
Pesticide	2009 (n = 136)	2010 (n = 132)	2011 (n = 139)	2012 (n = 147)	Total (n = 554)
Chlorpyrifos	50 (36.8%)	76 (57.6%)	74 (53.2%)	95 (64.6%)	295 (53.3% ± 11.8%)
Profenofos	48 (35.3%)	29 (22.0%)	22 (15.8%)	33 (22.4%)	132 (23.8% ± 8.2%)
Carbofuran	30 (22.1%)	26 (19.7%)	21 (15.1%)	31 (21.1%)	108 (19.5% ± 3.1%)
Methomyl	17 (12.5%)	13 (9.8%)	9 (6.5%)	13 (8.8%)	52 (9.4% ± 2.5%)
Oxamyl	0 (0.0%)	6 (4.5%)	6 (4.3%)	19 (12.9%)	31 (5.6% ± 5.4%)
Acephate	8 (5.9%)	9 (6.8%)	7 (5.0%)	6 (4.1%)	30 (5.4% ± 1.2%)
Methamidophos	11 (8.1%)	6 (4.5%)	8 (5.8%)	0 (0.0%)	25 (4.5% ± 3.4%)
Ethion	4 (2.9%)	5 (3.8%)	2 (1.4%)	11 (7.5%)	22 (4.0% ± 2.6%)
Phosmet	0 (0.0%)	4 (3.0%)	8 (5.8%)	0 (0.0%)	12 (2.2% ± 2.8%)
Carbaryl	1 (0.7%)	5 (3.8%)	0 (0.0%)	4 (2.7%)	10 (1.8% ± 1.7%)

表 7. 十處高頻度超標產地之「超標 (EIP)」及「違規 (TVEIP)」樣品之檢出頻度比較。

Table 7. Ten farmers' associations produced vegetables and fruit with highest EIP detection counts in 2009–2012.

		Detected frequency (EIP)					Detected frequency (TVEIP)				
Association	Detected vegetables	2009	2010	2011	2012	Total	2009	2010	2011	2012	Total
#1	Small leaf vegetables	12	11	6	9	38 (6.9%)	5	7	1	2	15 (5.8%)
#2	Small leaf vegetables	10	12	10	5	37 (6.7%)	4	7	4	1	16 (6.2%)
#3	Small leaf vegetables	10	10	7	6	33 (6.0%)	4	7	1	2	14 (5.4%)
#4	Small leaf vegetables	8	2	10	11	31 (5.6%)	5	2	3	5	15 (5.8%)
#5	Small leaf vegetables	7	10	3	9	29 (5.2%)	2	6	0	2	10 (3.9%)
#6	Bud of cabbage	2	5	8	5	20 (3.6%)	0	2	5	2	9 (3.5%)
#7	Small leaf vegetables	1	3	7	6	17 (3.1%)	4	5	2	0	11 (4.2%)
#8	Egg plant	6	2	5	4	17 (3.1%)	1	2	4	2	9 (3.5%)
#9	Beans and Shallot	5	6	6	0	17 (3.1%)	0	0	3	3	6 (2.3%)
#10	Small leaf vegetables	9	3	0	3	15 (2.7%)	0	2	0	1	3 (1.2%)
	Total					254 (45.8%)					108 (41.7%)

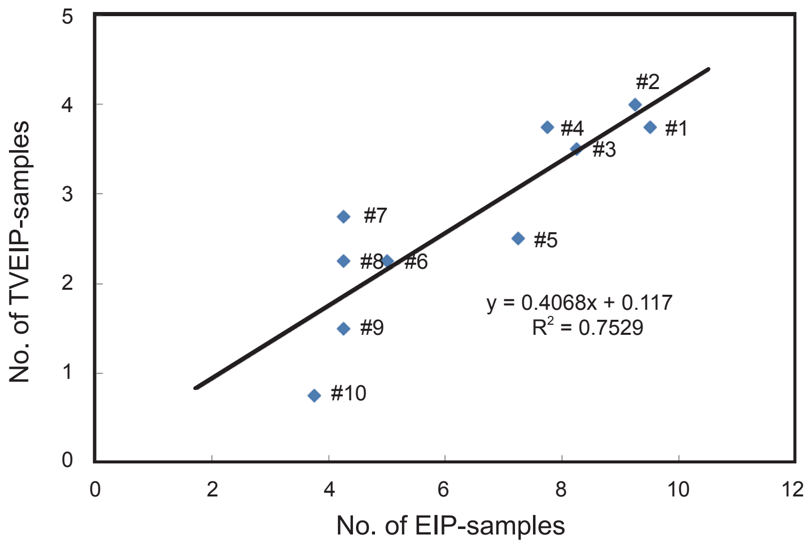

圖 2. 十處高頻度超標產地之違規相關性。

Fig. 2. The correlation of EIP-samples and TVEIP-samples in ten most high frequency residues detected farmers' associations.

有機磷類，替代佈飛松的狀況是明顯可見的。地緣不同時，尚有另一項影響因素，即可能與不同地區性農藥供應商所推銷用藥有關。而彰化縣另一項常檢出的「超標樣本」為茄子，與農民使用水溶性之覆滅蟎防治二點葉蟎有關。本研究發現殘留農藥之種類及頻度分布模式有其定則，與地緣及菜種等原因有關 (圖 3)，若累積足夠模式資料時，應有助於推論或追蹤未記名違規菜種之來源產地，也可用於預測何處產地、何種蔬果會有較高機率的農藥殘留問題產生。

討論

本研究欲以明確的範圍、技術及期間，進

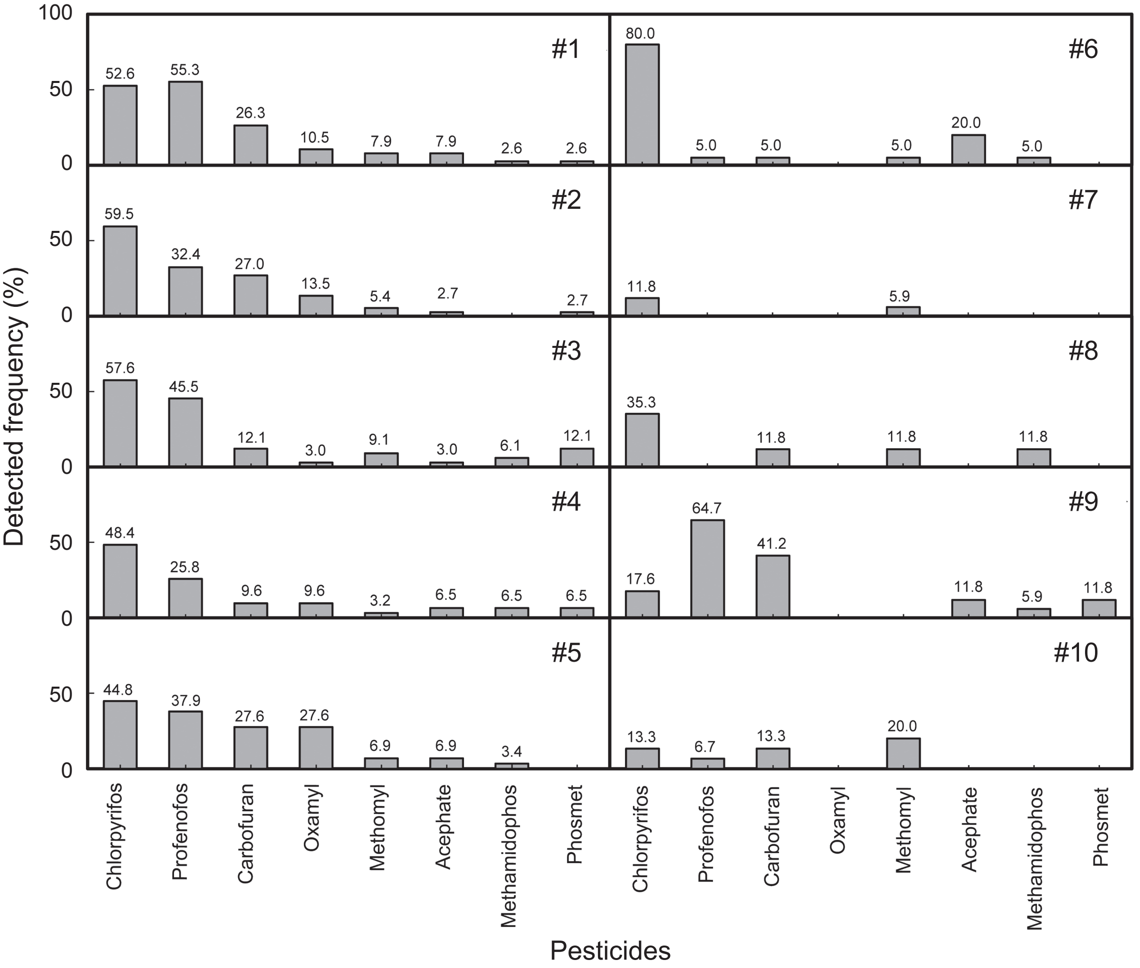

圖 3. 十處高頻度超標產地之用藥模式。

Fig. 3. The anticholinergic insecticides residues patterns of ten most high frequency residues detected farmers' associations.

行蔬果樣本之收集與分析，冀能闡明農藥殘留的實際內容。由乙醯膽鹼酯酶篩檢有機磷及氨基甲酸鹽兩大類殺蟲劑殘留之樣本進行分析，受檢農產品之種類、數量及來源等，均有詳實之記載，使後續之解析對策有所依據。此外，由分年資料差異可檢視結果之可信度。分析結果顯示，四年的分年資料重現性佳，亦即差異不顯著。結果明確呈現農民用藥具有習慣性，亦呈現台北市生化與化學聯檢系統，於技術面、法規面與執行面均已達成熟穩定之水準。

生化與化學聯檢系統所篩選之「超標樣本」具下列特質：(1) 均含有機磷或氨基甲酸鹽類之殘留，確認率超過 95%。(2) 平均含 3 種以上農藥，其中殺蟲劑佔 2/3、殺菌劑佔 1/3，且抗膽鹼農藥超過 1 種而有 CMG 的問題，以個別「容許量」評估安全性會有低估風險之可能。(3) 有五成樣本違反食品衛生管理法之農藥安全容許量規定。

就「生化法超標」與「容許量違規」之相關性分析結果，以檢出農藥之「數」與「量」進行比較，違規之 259 件樣本較未違規之 295 件高且有明顯之區隔。而全部超標樣本中有 47% 違規，其比率較 1996 年風險評估之 61% 為低。此外，在十處高頻度檢出產地超標樣本數與

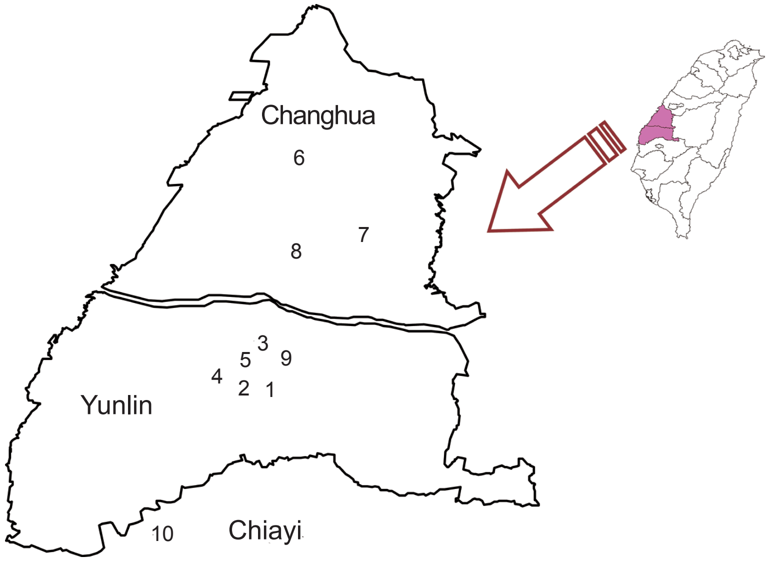

圖 4. 十處高頻度超標產地之地理相關位置。
Fig. 4. The geographic locations of ten most high frequency residues detected farmers' associations.

違規樣本數之相關性測試結果為正相關 (R^2 = 0.752，圖 2) ，因此，原訂之 45% 酵素抑制率為「超標標準」仍具沿用價值。

由超標樣本檢出之農藥殘留內容，(1) 可估算農民使用各類農藥與菜種及產地之關係。(表 6、表 7、圖 2 及圖 3) (2) 殘留農藥模式分析，建立與來源產地及菜種之相關性。(3) 檢視禁用劇毒農藥措施之成效，以及同類農藥之市場替代性。(4) 鑑定高風險菜種、產地及生產者之資訊，可供推廣安全用藥教育之規劃及實施。(5) 消費者之健康風險評估，以及消費指南資訊。(6) 各種農藥之實際殘留狀況，以供修訂容許量之用。

過去農藥殘留管理完全仰賴「容許量」之措施，不僅時效不足，且容許量是由單一農藥之毒理進行解析訂定，從未顧及與其他農藥共存時之風險，以致做出「藥是安全的，菜是否安全則是未知數」的判定，而實際上農作物是無法以單一農藥去完成蟲害管理，本研究由四年連續市場抽樣發現「超標樣本」平均含有 3.3 種農藥，「違規樣本」更含有高達 4.1 種農藥，如何能僅以單項藥劑之「容許量」為安全評判依據，把關國民健康。就抗膽鹼農藥混用率高達 1.4 種/件所衍生常態性之 CMG 問題，就絕非單一「容許量」之判定足以服眾。這已非「誤判」或「漏判」而是普遍「低估」殘留農藥之危險性，在美國 FQPA 法案[9] 中，主管殘毒之環保署 (EPA) 也認定 CMG 為首要解決事項，而重新調整逾千項之「容許量」[10]。而我國迄今尚未正視 CMG 問題。禁用劇毒農藥措施亦在本研究中，呈現因「市場替代性」而效果不彰，因此，農藥之殘留管理規範仍有繼續檢討與改進的必要。

防範農藥殘留之管理是以能在源頭產地進行為最佳，本研究顯示僅 2% 的高風險產地即能造成 40% 以上的農藥殘毒違規問題，若能經常性地偵測出此等產地，進行源頭管理加強監控農藥使用方式，將可大幅提升蔬果的安全品質。

---

[9] FQPA. 1996. Public law 104-170-AUG. 3, 1996.

[10] US EPA. 1996. Highlights of the Food Quality Protection Act of 1996. http://www.epa.gov/opp00001/regulating/laws/fqpa/fqpahigh.htm & US EPA. 1999. Implementing the Food Quality Protection Act Progress Report. http://www.epa.gov/opp00001/regulating/laws/fqpa/fqpareport.pdf

結論

此次研究由計畫性收集資料、層次性內容分析，及分年重現性良好之結果，可看出蔬果農藥殘留不僅有固定模式，且是有跡可循的，不同菜種、不同產地都有其固定用藥模式，藉由研究檢出之內容可找出問題來源，甚至尋求解決方案，如教育訓練，合理用藥等措施，此外更需顧及殘毒管制目的是「維護國民健康」，凡無助於保護消費者之「管理」即是浪費資源。台北市的聯檢制度雖尚有不足之處，但已確實達到為市民健康把關之目的，原定之生化法「超標標準」雖已使用18年，在此次評估顯示仍然適用，而在2009–2012四年中，經由聯檢系統及其合宜標準，成功攔阻412批，總重37,278 kg含毒蔬果，全數銷毀未流入市場，達到殘毒管制之真諦。但因抽檢幅度有限，仍需藉由研究問題所得之資訊，促使各高風險菜種之源頭產地生產者全面改進，方能大幅降低農藥殘毒之危害。

誌謝

本研究承台北市農產運銷股份有限公司協助檢驗資料之收集及違規樣品產地資料提供，謹致謝忱。

引用文獻

Anonymous. 1980. Guidelines to the Use of the WHO recommended classification of pesticides by Hazard. FAO Plant Protec. Bull. 28:1–24.

Bergmeyer, H. U., J. Bergmeyer, and M. Grassl. 1984. Acetylcholinesterase, colormetric method. p.57–63. *in*: Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 4. (Bergmeyer, H. U. ed.) Academic Press. New York. 2302 pp.

Chiu, C. S., C. H. Kao, and E. Y. Cheng. 1991. Rapid bioassay of pesticide residues (RBPR) on fruits and vegetables. J. Agric. Res. China 40:188–203.

Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7:88–95.

Liao, L. S. 2005. Practical Pesticide. Te Li Composite Ind. Ent. and Che Fac Press. Taichung. 1311 pp. (in Chinese)

Stahl, E. 1967. Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook. Springer-Verlag Press. Berlin. 979 pp.

Tseng, S. P., H. C. Su, W. T. Yu, H. K. Chou, J. F. Shyu, M. T. Chen, S. C. Yang, T. P. Lin, P. L. Shu, L. Y. Huang, W. J. Huang, I. F. Tsai, Y. F. Lee, J. Q. Pan, and H. F. Cheng. 2013. Monitoring of pesticide residues on agricultural products from markets and packing firms in Taiwan. Ann. Rept. Food Drug Res. 4:23–27. (in Chinese with English abstract)

US EPA. 2000. The Use of Data on Cholinesterase Inhibition for Risk Assessments of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. Office of Pesticide Programs Science Policy. Washington, DC. 53 pp.

The Study of Pesticide Residues Control by the Combination of AChE Screening and Chemical Analysis: The Taipei Model

Edward Yun Cheng[1], Yu-Bing Huang[2], Ming-Yao Chiang[2,*], Yi-Hsuan Hou[3], and Chun-Chi Nien[3]

Abstract

Cheng, E. Y., Y. B. Huang, M. Y. Chiang, Y. H. Hou, and C. C. Nien. 2015. The study of pesticide residues control by the combination of AChE screening and chemical analysis: The Taipei model. J. Taiwan Agric. Res. 64(1):53–63.

The pesticide residue problem on fruits and vegetables in the Taipei City wholesale market was investigated by both Acetylcholinesterase inhibition screening and the regulatory chemical residue analysis from 2009 to 2012. A total of 223,135 samples were screened and 554 samples were found with more than 45% inhibition on AChE activity (the enzyme inhibition positive; EIP), i.e., an indication of presences of neurotoxic pesticide residue, including organophosphate and/or carbamate. In chemical analysis through GC/MS, HPLC, and TLC, 95.1% of the EIP-samples were confirmed with the causing pesticide identities. In average, each EIP-sample contained 3.30 pesticides with an insecticide to fungicide ratio of 2 : 1, and a combined pesticide titer of 1.91 mg L^{-1}. Among the EIP-samples, 259 (46.9%) samples violated the tolerance regulation (TV) with average of 4.11 pesticides and combined titer of 3.15 mg L^{-1} for each TVEIP-sample. Since the practice of mixing several pesticides in spray has been confirmed in this study, the attention is then focused on the Common Mechanism Group (CMG) problem or the cumulative toxicity. The combined frequency of organophosphate and carbamate presence in 554 EIP-samples was 792 and the average was 1.41 per sample. Thus, the CMG problem is obvious in these neurotoxic anticholinergic pesticides. The safety judgment by the individual organophosphate and carbamate pesticide tolerance will underestimate the danger of their combined residues. The highest frequencies detected for anticholinergic pesticides were chlorpyrifos (53.3%), profenofos (23.8%), carbofuran (19.5%), etc. High residue risk vegetable and fruit production farmer organizations were identified in the study, a total of 254 EIP-samples (45.9%) came from only ten farmers' associations. Among them, there were 108 tolerance violations (41.7%), the correlation between the EIP cases and TVEIP cases in those ten farmers' association is positive (R^2 = 0.752). The pesticides mixing pattern are similar in these adjacent production organizations, and can be used as a tool to trace the origin of residue contaminated farm products with unknown sources. The residue analysis results of 2009–2012 were similar in all aspects with no significant differences between years. The AChE/Chemical combined analysis for pesticide residues control has been a regular practice in Taipei City since 1985. Its purpose is to intercept by rapid enzyme toxicity test. The residues contaminated vegetables and fruits before it have been sold to consumers. From 2009 to 2012, a total of 37,278 kg of residues contaminated vegetables and fruits were taken off from the market and destroyed to protect the consumers.

Key words: Pesticide, Residues, Fruits and Vegetables, Acetylcholinesterase.

Received: September, 12, 2014; Accepted: November, 28, 2014.

[*] Corresponding author; e-mail: mingyaw@tari.gov.tw
[1] Former Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellows, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Research Assistants, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(1):64–73 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06401.07
研究簡報

芒果 (*Mangifera indica* L.) 種原形態特性之調查與分析

邱輝龍[1] 石家宇[2] 邱國棟[3,*]

摘要

邱輝龍、石家宇、邱國棟。2015。芒果 (*Mangifera indica* L.) 種原形態特性之調查與分析。台灣農業研究 64(1):64–73。

台灣栽培之芒果 (*Mangifera indica* L.) 品種雖然眾多，但國內不具野生種及其近緣種，故栽培上仍以引進種為主。引種自荷蘭時期即開始，且從 1970 年起台灣陸續有自行育種的芒果品種問世，種原相當豐富與多樣化。掌握種原特性關係著遺傳改良的成敗，本文建立 11 份芒果種原材料的基本資料供未來品種鑑定與改良的參考。

關鍵詞：芒果、質量性狀、數量性狀。

前言

台灣芒果 (*Mangifera indica* L.) 栽培品種皆為引進之外來種，國內不具野生種及其近緣種。從荷蘭時期引進的在來種 (「柴檨」、「香檨」、「肉檨」及「柿果檨」)，到 1954 年由美國引進的「愛文」(‘Irwin’) 等 5 個品種及 1967 年到 1970 年由東南亞引進 30 多個品種，1970 年起台灣陸續有自行育種的芒果問世，如 1985 年的「台農 1 號」與「台農 2 號」及 1976 年的「金煌」(Lee *et al*. 2009; Chiou & Lee 2012; Lee & Chiou 2013)，台灣芒果種原越來越豐富與多樣化。實生選種與雜交是芒果品種改良的主要方式，而種原特性的掌握往往關係著品種改良的成敗。本研究以行政院農委會農業試驗所作物種原組與鳳山分所保存的芒果種原為材料，進行形態性狀的調查與分析，建立芒果種原材料的基本資料供品種鑑定與改良的參考。

材料與方法

供試材料取自行政院農委會農業試驗所作物種原組及鳳山分所芒果種原保存園的材料，包括「台農 1 號」(‘Tainung No.1’)、「金煌」(‘Jin-Huang’)、‘Baptesti’、「杉林」(‘Shan-Lin’)、「金煌 2 號」(‘Jin-Huang No.2’)、「愛德華」(‘Edward’)、「聖心」(‘Sensation’)、「卓安南」(‘Chokanan’)、「新吉皇」(‘New-Ji-Huang’)、「吉皇」(‘Ji-Huang’)、「滿天果」(‘Man-Tian-Guo’) 等 11 份材料 (表 1)。

依據 2006 年國際植物遺傳資源研究所 (International Plant Genetic Resources Institute; IPGRI) 出版之《芒果性狀描述簿》(*Descriptors for Mango*) 調查與描述材料之質量 (qualitative) 性狀特性，而部份數量 (quantitative) 性狀則依下列方法測量：(1) 果肉率 (%) 為 (果實重 − 果皮重 − 果核重) ÷ 果實重 × 100%；(2) 可溶性固形物含量 (°Brix) 為滴 1 mL 供試材料果實汁液至糖度計上之數值；(3) 可滴定酸含量 (%) 為取 1 mL 供試材料果實汁液加入酚酞指示劑，然後以 0.1 M NaOH 開始滴定，待溶液顏色由紅色轉為透明時計算滴定量，接著帶入公式算出滴定酸含量，公式為 (X × 0.9524 × 0.0067) ÷ 1 × 100%，其中 X 為滴定量、酸

投稿日期：2014 年 8 月 5 日；接受日期：2014 年 11 月 7 日。
* 通訊作者：kuodung@fthes-tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所作物種原組助理研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所作物種原組研究助理。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所熱帶果樹系助理研究員。台灣 高雄市。

表 1. 供試的芒果種原清單。

Table 1. List of 11 evaluated mango accessions collected from the field Germplasm Bank at TARI.

Genotype	Origin
Baptesti	St. Lucia
Edward	USA
Sensation	USA
Chokanan	Thailand
Man-Tian-Guo	Malayan peninsula
Shan-Lin	Taiwan
Tainung No.1	Taiwan
Jin-Huang	Taiwan
Jin-Huang No.2	Taiwan
Ji-Huang	Taiwan
New-Ji-Huang	Taiwan

係數為 0.0067、常數 f 為 0.9524。每份材料之每個性狀以 6–10 個單株進行資料調查。

結果

供試 11 種芒果種原的質量性狀特性如表 2 所示，數量性狀特性則列於表 3。

芒果種原的營養生長特性 (vegetative characterizations)

葉片 (lamina) 均為長橢圓 - 披針形 (Oblong-lanceolate)，厚革質，螺旋排列於枝條，先端 (apex) 漸尖 (acute)。葉緣除「金煌」為平展、「愛德華」為深波狀外，其餘 9 品種均為波狀。葉長以「金煌」的 22.90 cm 最長，「滿天果」的 15.04 cm 最短；葉寬則以「金煌」的 6.54 cm 最寬，「台農 1 號」的 4.32 cm 最窄。葉脈 (vein) 除「杉林」外均明顯。「台農 1 號」、「杉林」、「愛德華」與「聖心」成熟葉片呈深綠色，其餘 7 品種呈綠色；「新吉皇」嫩葉亮綠帶淡褐，‘Baptesti’ 深紅褐色，「金煌」與「吉皇」為深桐褐色，其餘 7 品種均呈淡紅褐色。除「卓安南」葉片有香氣外，其餘 10 品種均無香氣。

葉柄為葉鞘與中肋的過渡區域，平均以「金煌」的 2.78 cm 最長，「台農 1 號」的 1.63 cm 最短，均半直立着生於枝條上。

芒果種原的生殖生長特性 (reproductive characterizations)

花序：花序均屬圓錐花序 (Conical)，通常自枝條頂端抽出，除「金煌」花序中的小花生長鬆散外，其餘 10 品種均為密生。花序長度以「金煌」的 58.87 cm 最長，「滿天果」的 19.45 cm 最短；寬度則也以「金煌」的 37.22 cm 最寬，「滿天果」的 14.24 cm 最窄。‘Baptesti’ 的花梗顏色綠色帶有紅斑，「杉林」、「金煌 2 號」與「新吉皇」則呈深紅色，其餘 7 品種均呈亮紅色。除 ‘Baptesti’ 的花梗無披絨毛外，其餘 10 品種皆有批絨毛。供試材料的花序均有葉狀苞片。

小花直徑以「滿天果」的 8.16 mm 最長，「台農 1 號」與「聖心」的 6.69 mm 最短；‘Baptesti’、「杉林」與「愛德華」僅具 5 瓣 (pentamerous)，其餘則兼具 4 瓣 (tetramerous) 和 5 瓣。雄蕊 5 枚，除「新吉皇」3 枚具稔性外，其餘皆 1–2 枚具稔性。

果實與種子：「金煌」、「愛德華」、「卓安南」、「吉皇」、「新吉皇」的果實形狀為長橢圓形 (elliptic)，其餘則為橢圓形 (oblong)。成熟果皮顏色「吉皇」與「聖心」為紅色，「新吉皇」為綠色，「台農 1 號」為黃帶粉紅色，「杉林」為黃帶紅色，其餘則為黃色。「聖心」的果皮厚度為中厚，其餘則薄；‘Baptesti’ 的果皮質地粗糙，其餘光滑。「杉林」果肉呈橙色，而 ‘Baptesti’、「金煌」、「金煌 2 號」與「新吉皇」則為橙黃，其餘皆為黃色。

果實長度、寬度、厚度與重量均以「金煌」的 21.33 cm、11.19 cm、9.77 cm 及 1.26 kg 最長厚與重，「台農 1 號」的果實長度 (10.27 cm)、寬度 (7.90 cm) 最短窄，果實厚度則以「滿天果」的 6.88 cm 最薄。果皮重量同樣以「金煌」的 143.78 g 最重，「台農 1 號」的 36.71 g 最輕。

大多數材料的果肉質地軟，僅 ‘Baptesti’ 與「愛德華」質地較堅實，而「杉林」與「新吉皇」的果肉多汁。供試材料均容易剝皮，「新吉皇」果肉中有纖維，其餘皆無。果肉率「金煌」、「金煌 2 號」、「杉林」、「吉皇」、「卓安南」與「滿天果」均達 80% 以上，最低則為

表 **2.** 芒果種原之質量性狀特性。

Table 2. Characterization of qualitative traits of *Mangifera indica* L. based on ‘Descriptors for Mango’ (IPGRI 2006).

Trait	Characterization						
	Tainung No.1	Jin-Huang	Baptesti	Shan-Lin	Jin-Huang No.2	Edward	Sensation
A. Vegetative trait							
Leaf blade shape	Oblong-lanceolate	Oblong-lanceolate	Oblong-lanceolate	Oblong-lanceolate	Oblong-lanceolate	Oblong-lanceolate	Oblong-lanceolate
Colour of young leaf	Light red-brown	Dark brown-tong	Dark red-brown	Light red-brown	Light red-brown	Light red-brown	Light red-brown
Leaf texture	Coriaceous	Coriaceous	Coriaceous	Coriaceous	Coriaceous	Coriaceous	Coriaceous
Leaf apex shape	Acute	Acute/sharp	Acute	Acute	Acute	Acute	Acute
Leaf margin	Wavy	Entire	Wavy	Wavy	Wavy	Deep wavy	Wavy
Colour of fully developed leaf	Dark green	Green	Green	Dark green	Green	Dark green	Dark green
Leaf fragrance	None	None	None	None	None	None	None
B. Reproductive trait							
I. Inflorescence							
Inflorescence position	Terminal	Terminal	Terminal	Terminal	Terminal	Terminal	Terminal
Inflorescence axis shape	Conical	Conical				Conical	Conical
Density of flowers in inflorescence	Sparse	Dense	Sparse	—[z]	Sparse	Sparse	Sparse
Inflorescence colour	Red	Red	Green with red patches	Dark red	Dark red	Red	Red
Pubescence of inflorescence rachis	Pubescent	Pubescent	absent	Pubescent	Pubescent	Pubescent	Pubescent
Presence of leaf bracts	Present	Present	Present	Present	Present	Present	Present
Type of flower	Both (Pentamer-ous/ Tetramerous)	Both	Pentamerous	Pentamerous	Both	Pentamerous	Both
Number of stamens/staminodes	5 (1–2 fertile)	5 (1–2 fertile)	5 (1–2 fertile)	5 (1–2 fertile)	5 (1–2 fertile)	5 (1–2 fertile)	5 (1–2 fertile)

表 2. 芒果種原之質量性狀特性。(續)

Table 2. Characterization of qualitative traits of *Mangifera indica* L. based on ‘Descriptors for Mango’ (IPGRI 2006). (continued)

Trait	Characterization						
	Tainung No.1	Jin-Huang	Baptesti	Shan-Lin	Jin-Huang No.2	Edward	Sensation
B. Reproductive trait							
II. Fruit and seed							
Fruit shape	Oblong	Elliptic	Oblong	Oblong	Oblong	Elliptic	Oblong
Skin colour of ripe fruit	Yellow with pink	Yellow	Yellow	Yellow with red	Yellow	Yellow	Red
Fruit skin surface texture	Smooth	Smooth	Rough	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth
Pulp colour of ripe fruit	Yellow	Yellow-orange	Yellow-orange	orange	Yellow-orange	Yellow	Yellow
Pulp texture of ripe fruit	Soft	Soft	Firm	Juicy	Soft	Firm	Soft
Adherence of fruit skin to pulp	Absent (free)	Absent (free)	Absent (free)	Absent (free)	Absent (free)	Absent (free)	Absent (free)
Seed shape	Oblong reniform	Oblong reniform	Reniform	Reniform	Oblong reniform	Reniform	Reniform
Type of embryony	Monoembryony	Monoembryony	Monoembryony	Monoembryony	Monoembryony	Monoembryony	Monoembryony
Fruit sinus type	Absent	Absent	Absent	Absent	Present	Absent	Absent
Shape of fruit apex	Obtuse to round	Obtuse to round	Obtuse to round	Obtuse to round	Acute	Obtuse to round	Obtuse to round
Fruit neck prominence	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Present
Density of lenticels on fruit skin	Sparse	Sparse	Sparse	Sparse	Sparse	Sparse	Sparse

表 2. 芒果種原之質量性狀特性。(續)

Table 2. Characterization of qualitative traits of *Mangifera indica* L. based on 'Descriptors for Mango' (IPGRI 2006). (continued)

	Characterization			
Trait	Chokanan	New-Ji-Huang	Ji-Huang	Man-Tian-Guo
A. Vegetative trait				
Leaf blade shape	Oblong-lanceolate	Oblong-lanceolate	Oblong-lanceolate	Oblong-lanceolate
Colour of young leaf	Light red-brown	Light green with pale brown	Dark brown-tong	Light red-brown
Leaf texture	Coriaceous	Coriaceous	Coriaceous	Coriaceous
Leaf apex shape	Acute	Acute	Acute	Acute
Leaf margin	Wavy	Wavy	Wavy	Wavy
Colour of fully developed leaf	Green	Green	Green	Green
Leaf fragrance	Present	None	None	None
B. Reproductive trait				
I. Inflorescence				
Inflorescence position	Terminal	—[z]	—	Terminal
Inflorescence axis shape	Conical	—		Conical
Density of flowers in inflorescence	Sparse	—	—	Sparse
Inflorescence colour	Green with red patches	Red	—	Green with red patches
Pubescence of inflorescence rachis	Pubescent	Pubescent	—	Pubescent
Presence of leaf bracts	Present	Present	—	Present
Type of flower	Both	—	—	Both
Number of stamens/staminodes	5 (1–2 fertile)	5 (3 fertile)	—	5 (1–2 fertile)

表 **2.** 芒果種原之質量性狀特性。(續)

Table 2. Characterization of qualitative traits of *Mangifera indica* L. based on ‘Descriptors for Mango’ (IPGRI 2006). (continued)

Trait	Characterization			
	Chokanan	New-Ji-Huang	Ji-Huang	Man-Tian-Guo
B. Reproductive trait				
II. Fruit and seed				
Fruit shape	Elliptic	Elliptic	Elliptic	Oblong
Skin colour of ripe fruit	Yellow	Green	Red	Yellow
Fruit skin surface texture	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth
Pulp colour of ripe fruit	Yellow	Yellow-orange	Yellow	Yellow
Pulp texture of ripe fruit	Soft	Juicy	Soft	Soft
Adherence of fruit skin to pulp	Absent (free)	Absent (free)	Absent (free)	Absent (free)
Seed shape	Reniform	—[z]	Reniform	Reniform
Type of embryony	Polyoembryony	—	Monoembryony	Monoembryony
Fruit sinus type	Present	Present	Present	Present
Shape of fruit apex	Acute	Obtuse to round	Obtuse to round	Obtuse to round
Fruit neck prominence	Absent	Absent	Absent	Absent
Density of lenticels on fruit skin	Sparse	Medium	Sparse	Sparse

[z] Not available.

表 3. 芒果種原之數量性狀特性。

Table 3. Characterization of quantitative traits of *Mangifera indica* L. based on 'Descriptors for Mango' (IPGRI 2006).

Trait	Characterization					
	Tainung No.1	Jin-Huang	Baptesti	Shan-Lin	Jin-Huang No.2	Edward
A. Vegetative trait						
Lamina length (cm)	19.15	22.90	19.96	19.76	22.18	18.75
Lamina width (cm)	4.32	6.54	4.44	4.50	5.42	40.77
Petiole length (cm)	1.63	2.78	2.54	2.86	2.56	2.67
B. Reproductive trait						
Inflorescence length (cm)	35.80	58.87	35.62	27.92	45.85	29.44
Inflorescence width (cm)	17.06	37.22	29.32	16.58	28.61	18.59
Flower radius (mm)	6.69	7.94	6.97	7.61	7.52	7.52
Fruit length (cm)	10.27	21.33	9.68	9.93	19.20	11.94
Fruit width (cm)	7.90	11.19	8.02	8.10	9.55	9.20
Fruit radius (cm)	7.09	9.77	7.29	7.56	8.35	8.72
Fruit weight (g)	317.62	1264.21	328.94	335.68	884.27	460.81
Skin weight (g)	36.71	143.78	50.91	36.02	103.05	72.64
Pulp ratio (%)	79.04	82.90	75.62	80.51	80.95	76.32
Pulp total souble solids (°Brix)	14.92	23.77	22.76	16.74	16.30	19.64
Pulp titratable acidity (%)	—[z]	—	0.48	0.22	0.22	0.49
Seed length (cm)	8.15	18.74	7.67	7.34	17.68	9.81
Seed width (cm)	4.14	5.69	3.66	4.42	4.45	4.94
Seed weight (g)	2.00	85.05	29.30	29.42	59.40	40.31
Seed thickness (cm)	1.78	2.10	1.83	1.77	1.99	1.76

Trait	Characterization				
	Sensation	Chokanan	New-Ji-Huang	Ji-Huang	Man-Tian-Guo
A. Vegetative trait					
Lamina length (cm)	19.90	18.60	19.16	18.87	15.04
Lamina width (cm)	5.38	4.50	5.43	4.92	4.54
Petiole length (cm)	2.90	1.76	2.71	2.33	2.15
B. Reproductive trait					
Inflorescence length (cm)	35.80	36.62	—[z]	—	19.45
Inflorescence width (cm)	17.06	26.14	—	—	14.24
Flower radius (mm)	6.69	6.92	—	—	8.16
Fruit length (cm)	10.27	16.79	11.81	16.90	13.90
Fruit width (cm)	7.99	8.24	7.81	9.89	8.14
Fruit radius (cm)	76.86	7.15	7.59	8.72	6.88
Fruit weight (g)	327.72	461.75	226.59	851.59	448.68
Skin weight (g)	48.73	58.48	57.24	92.08	45.57
Pulp ratio (%)	73.47	80.18	69.29	83.34	82.05
Pulp total souble solids (°Brix)	14.52	17.48	—	17.43	18.60
Pulp titratable acidity (%)	0.34	0.37	—	0.21	0.19
Seed length (cm)	8.42	14.59	9.59	12.61	11.85

表 3.　芒果種原之數量性狀特性。(續)

Table 3.　(*Cont.*) Characterization of quantitative traits of *Mangifera indica* L. based on 'Descriptors for Mango' (IPGRI 2006). (continued)

Trait	Characterization				
	Sensation	Chokanan	New-Ji-Huang	Ji-Huang	Man-Tian-Guo
Seed width (cm)	4.58	4.60	4.03	4.72	4.25
Seed weight (g)	38.22	33.05	12.35	49.81	34.85
Seed thickness (cm)	2.81	1.59	1.21	2.02	1.52

[z] Not available.

「新吉皇」，但也將近 70%。可溶性固形物含量以 'Baptesti' 的 22.76°Brix 最高，「金煌」的 14.18°Brix 最低；可滴定酸含量以「愛德華」的 0.49% 最高，「滿天果」的 0.91% 最低。

「金煌」、「金煌 2 號」與「聖心」的果實成熟期較晚，'Baptesti'、「台農 1 號」、「杉林」、「愛德華」、「新吉皇」、「吉皇」與「滿天果」較早，而「卓安南」則是供試材料中可周年採收的。除「新吉皇」品質中等外，其餘供試材料的食用品質均佳。

果柄著生處之果基「聖心」呈微突，「台農 1 號」呈微陷，「金煌」與「卓安南」平坦，其餘則呈凹陷狀態。除「聖心」外，供試材料均留有花柱痕跡，其中 'Baptesti' 呈下陷狀，「滿天果」呈乳頭狀，「台農 1 號」、「金煌」與「卓安南」呈尖頭狀，其餘 5 品種則呈突起狀。

種子形狀方面，除「台農 1 號」與「金煌」為長橢圓形，其餘都是長橢圓形—腎形；「卓安南」種子的胚性為多胚外，其餘均為單胚。「金煌」、'Baptesti'、「台農 1 號」、「杉林」、「愛德華」與「聖心」的種子無彎曲 (sinus)，其餘的材料則有，除「金煌 2 號」彎曲較深外，其餘 4 品種種子彎曲淺。果核長度介於 7.34–18.74 cm，寬度介於 3.66–5.69 cm，厚度介於 1.52–2.81 cm之間，重量則介於2.00–85.05 g。

討論

嚴謹與詳實的基本資料 (passport data) 與特性資料 (characteristics data) 是搜尋、交換與利用種原材料之基礎，因此種原材料特性之描述 (characterization) 與評估 (evaluation) 一直都是世界各地遺傳資源中心最主要且最繁重的工作之一 (Rogers *et al*. 1975; Nakagahra 1994; Subedi *et al*. 2008; Ribeiro *et al*. 2013)。國際生物多樣性中心 (Bioversity International) 出版多種作物之性狀描述簿 (descriptor)，供種原工作人員參考使用。《芒果作物之性狀描述簿》於 2006 年出版 (IPGRI 2006)。

台灣芒果育種目標為育成中型果 (400–600 g)、果皮鮮艷、外觀佳、風味佳、纖維少、果肉率高及具抗 (耐) 性等特性品種 (Lee & Chiou 2013)。引種及蒐集地方品系為育種的方法之一，台灣芒果遺傳資源自荷蘭時期引進加上自行選育迄今，種原相當豐富與多樣化。如何進一步利用這些材料進行雜交與實生選種，則需嚴謹與詳實的性狀調查與評估資料。本所鳳山分所保存相當豐富的芒果種原，掌握種原特性關係著遺傳改良的成敗，因此應加速建立芒果種原材料的基本資料供未來品種鑑定與改良的參考。

引用文獻

Chiou, K. D. and W. L. Lee. 2012. Mango breeding in Taiwan. p.9–20. *in*: Proceedings of the Symposium on Mango Industry Development in Taiwan. (Chiou, K. D., C. L. Wang, and H. T. Shih, eds.) Special Pub. of Taiwan Agric. Res. Inst. No. 168. Taichung. 101 pp. (in Chinese)

IPGRI. 2006. Descriptors for Mango (*Mangifera indica* L.). International Plant Genetic Resources Institute. Rome. 60 pp.

Lee, S. R. and K. D. Chiou. 2013. Mongo breeding in Taiwan. p.65–73. *in*: Proceedings of A Symposium on Breeding of Fruit Crops in Taiwan. (Ke, L. S. and C. R. Yen, eds.) Department of Plant Industry, National

Pingtung University of Science and Technology. Pingtung. 198 pp. (in Chinese with English abstract)

Lee, W. L., K. D. Chiou, and I. S. Weng. 2009. Study on genetic variations of mango (*Mangifera indica* L.) germplasm. J. Taiwan Agric. Res. 58:243–253. (in Chinese with English abstract)

Nakagahra, M. 1994. Operations and management of the national plant germplasm system in Japan. p.17–28. *in*: Plant Germplasm Conservation: Perspectives for the 2000s. (Tu, C. C., T. T. Chang, M. J. Fan, and J. Y. Wang, eds.) Taiwan Agricultural Research Institute Press. Taichung. 149 pp.

Ribeiro, I. C. N. S., C. A. F. Santos, and F. P. L. Neto. 2013. Morphological characterization of mango (*Mangifera indica*) accessions based on Brazilian adapted descriptors. J. Agric. Sci. Tech. 3:798–806.

Rogers, D. J., B. Snoad, and L. Seidewitz. 1975. Documentation for genetic resources centers. p.399–405. *in*: Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow. (Frankel, O. H. and J. G. Hawkes, eds.) Cambridge University Press. London. 514 pp.

Subedi, A., J. Bajracharya, B. K. Joshi, S. R. Gupta, H. N. Regmi, and B. Sthapit. 2008. Locating and managing the mango (*Mangifera indica* L.) genetic resources in Nepal. Pl. Genet. Resour. Newslett. 155:52–61.

Morphological Characterization of *Mangifera indica* L. in Taiwan

Hui-Lung Chiu[1], Jia-Yu Shin[2], and Kuo-Dung Chiou[3,*]

Abstract

Chiu, H. L., J. Y. Shin, and K. D. Chiou. 2015. Morphological characterization of *Mangifera indica* L. in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 64(1):64–73.

There are no wild and relatives of *Mangifera indica* L. in Taiwan. All cultivars were introduced. The selection and breeding programs were started since 1970. To date, there are abundant mango genetic resources in Taiwan. Rigorous and detailed passport data and characteristics data are the basic for germplasm utilization. Eleven accessions of mango conserved at Plant Germplasm Division and Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute were characterized for future utilization.

Key words: *Mangifera indica* L., Qualitative traits, Quantitative traits.

Received: August 5, 2014 ; Accepted: November 7, 2014.

[*] Corresponding author, e-mail: kuodung@fthes-tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellow, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[2] Research Assistant, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Assistant Research Fellow, Department of Tropical Fruit Trees, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(1):74–79 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06401.08

研究簡報

胡瓜嵌紋病毒火球花分離株之鑑定與檢測

陳金枝 [1,*]　江芬蘭 [2]

摘要

陳金枝、江芬蘭。2015。胡瓜嵌紋病毒火球花分離株之鑑定與檢測。台灣農業研究 64(1):74–79。

本研究由火球花 (*Haemanthus multiflorus* Martyn.) 葉片呈現黃斑病徵者取其罹病組織，經由汁液機械接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片所得之單斑 (single lesion) 而獲得 YS1 分離株。續於間接式酵素連結免疫反應 (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect-ELISA) 中，火球花自然罹病葉、YS1 分離株所感染之奎藜局部病斑及菸草 (*Nicotiana benthaminana* Domin) 系統性嵌紋病葉等受測樣品，均可與胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) 多元抗體產生正反應。而於反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 反應中，上述 3 種受測樣品之全量核酸，均可與 CMV 引子對 (CMV-up/CMV-dw) 產生預期大小約 485 bp 之核酸片段。YS1 之鞘蛋白 (YS1-CP) 核酸序列登錄於 GenBank 取得核酸分子序號為 KM066122，YS1-CP 之胺基酸序列與其他已知 CMV 之相同度均高於 90%。由血清學及核酸分子特性之鑑定結果，顯示由火球花分離而得之 YS1 為 CMV 之分離株。CMV 寄主範圍廣泛，本研究之結果乃 CMV 之新寄主紀錄。本研究分別以 TPS (Thomson & Dietzgen 1995) 及自製之 PSE 緩衝液快速萃取罹病植物組織之全量核酸，以其為模板進行 RT-PCR，均可成功增幅出 YS1 病毒之預估核酸片段，結果證實此種核酸快速萃取法可用於 CMV 之核酸快速檢測，具有相當高之應用潛力。

關鍵詞：胡瓜嵌紋病毒、火球花、免疫分析、RT-PCR 快速檢測。

前言

火球花 (*Haemanthus multiflorus* Martyn)，英名 Blood lily，別名紅繡球、血百合、網球花，屬於石蒜科火球花屬多年生之球根花卉，原產於熱帶非洲，國內常作為庭園或盆栽花卉。CMV 為 *Bromoviridae* 科 *Cucumovirus* 屬成員，病毒顆粒為球形多面體，直徑約 28–30 nm (Pacios & Garcia-Arenal 2006)。基因體由 4 段大小不等之 RNA 核酸組成，RNA 3 帶有對應 3a 移動蛋白 (movenment protein; MP) 及鞘蛋白 (coat protein; CP) 之核酸序列 (Zitter & Murphy 2009)。CMV 遍佈全球且寄主範圍相當廣 (Francki *et al*. 1979)，包括豆類、茄科、瓜類、果樹及花卉等重要作物，有將近 100 科超過 1,000 種 (species) 之單子葉及雙子葉植物種類 (Edwardson & Christie 1991)。CMV 可藉由汁液機械傳播或種子傳播 (Ali & Kobayashi 2010)，在自然界乃藉由蚜蟲以非永續型方式傳播 (Zitter & Murphy 2009)。

本研究針對由台中霧峰區火球花植株葉片呈現黃斑病徵 (圖 1A) 所採集之樣品而獲得一種病毒分離株 (代號 YS1)，詳述以血清學及分子生物學診斷鑑定此分離株之結果，並應用核酸快速萃取方式所獲得之罹病組織全量核酸，可成功進行 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 之核酸快速檢測，簡化核酸檢測之流程。

投稿日期：2014 年 7 月 31 日；接受日期：2014 年 11 月 12 日。
[*] 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。

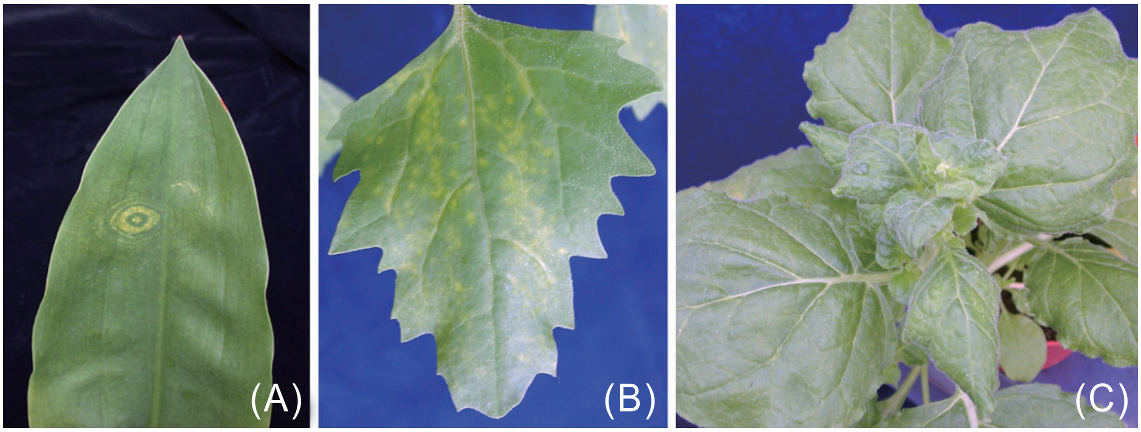

圖 1. *Cucumber mosaic virus* (CMV) 發生於田間火球花上之病徵、由火球花 CMV-YS1 分離株接種奎藜及菸草後產生之病徵。(A) 田間檢出有 *Cucumber mosaic virus* (CMV) 之火球化葉片上呈現之黃斑病徵；(B) YS1 分離株接種奎藜葉片後出現之局部病斑；及 (C) 接種菸草造成之系統性嵌紋病徵。

Fig. 1. Symptoms observed on leaf of the natural growth blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn) infected by *Cucumber mosaic virus* (CMV), and symptoms developed on *Chenopodium quinoa* and *Nicotiana benthamiana* caused by the YS1 isolate from blood lily. (A) Yellow spot observed on leaf of CMV-infected bloody lily; (B) Local lesions on leaf of *C. quinoa*; and (C) Systemic mosaic on plant of *N. benthamiana*.

材料與方法

自台中市霧峰區之私人庭園所栽種的火球花植株上，採取葉片呈現黃斑病徵之罹病組織進行相關試驗。於接種試驗中，將火球花黃斑組織以 0.05 M 之磷酸鉀緩衝液 (potassium phosphate buffer, pH 7.5)，依 1 : 10 (g mL^{-1}) 比例研磨成汁液，將研磨汁液接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片上，接種後約 3–4 d 於奎藜葉片上產生黃化局部斑點 (圖 1B)，挑取單一病斑經 3 次重複接種篩選，獲得一分離株，其代號為 YS1。將 YS1 繁殖於奎藜葉片之局部病斑 (local lesions) 研磨汁液接種於菸草 (*Nicotiana benthaminana* Domin.) 上，約 5–7 d 後產生系統性嵌紋病徵 (圖 1C)。

於血清法鑑定中，將火球花黃斑罹病組織及 YS1 分離株感染後之奎藜單斑與菸草病葉組織，與本研究室以往所製備及保存之菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*; TMV)、番椒黃化病毒 (Capsicum chlorosis virus; CaCV)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) (Chen *et al*. 2000) 等多元抗體，以及市售之 *Potyvirus* 屬單元抗體 (Agdia Inc., USA) 等，以間接式酵素連結免疫吸附分析法 (indirect enzyme-linked immunosorbent assay; indirect ELISA) 進行反應分析。ELSIA 步驟乃參照以往研究進行 (Clark & Adams 1977)，最終呈色反應加入濃度為 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶酵素基質 (p-NPP) (Amresco, Solon Ind., USA)。加入 p-NPP 溶液反應 40 min 後，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，樣品吸收值大於 2 倍之健康葉片吸收值者視為正反應。

結果與討論

根據試驗結果，發現受測罹病樣品均僅與 CMV 之抗體產生明顯正反應，其 ELISA 讀值 (A_{405}) 均在 1.5–3.0 之間 (結果未列出)，且其他無黃斑病徵之火球花植株對照，亦未檢出 CMV 反應。根據血清學鑑定結果顯示，由火球花黃斑罹病組織分離之 YS1 病毒株乃與 CMV 有血清關係之病毒。

核酸分子鑑定與檢測方面，以植物核酸微量萃取試劑組 (RNeasy Plant Mini kit, Qiagen, Germany) 所建議之純化流程，進

行 YS1 分離株繁殖於奎藜的局部病斑全量核酸 (total RNAs) 之萃取與純化，以可增幅 CMV RNA 3 核酸分子之引子對 CMV3a-up/CMVCP-dw (5'GTCCRCRCATKTGWGTC-GTG/5'ATTTCTCCACGACTGA CCA T) 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (reverse-transcription polymerase-chain reaction; RT-PCR)，此引子對預期可增幅包含 CMV 之 3a 移動蛋白 (MP) 及鞘蛋白 (CP) 共約 2.2 kb 之核酸片段。反應乃參照單步驟 RT-PCR 試劑組 (GeneMark Technology Co. Ltd., Tainan, Taiwan) 提供之配方進行，於總體積為 25 μL 之反應液中混合有 2 μL 之受測樣品全量核酸、各 2.5 μL 之 10 μM CMV3a-up/CMVCP-dw 引子。於熱循環反應儀 (GeneAmp Model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA) 中進行核酸增幅反應。反應條件為 50℃進行反轉錄反應 30 min，94℃下變性 1 min，50℃下煉合 50 s，72℃下聚合 2 min，共 26 個循環，最後一個步驟以 72℃聚合 6 min，增幅之產物以 1.2% agarose 進行電泳分析。受測樣品之 PCR 產物經核酸電泳分析，獲得一個與預估相符約 2.2 kbp 之核酸片段 (結果未列出)。將此核酸片段構築於 pCRII-TOPO 載體上 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，篩選具有預估 PCR 產物之轉型株，送交明欣生物科技有限公司 (台北，台灣) 進行核苷酸定序。

分析結果顯示，YS1 分離株之 2.2 kb 核酸片段內含有對應 CMV 之 3a 移動蛋白 (MP) 及鞘蛋白 (CP) 之完整轉譯架構 (open reading frame) (Hwang *et al*. 2007)，於對應 MP 部分包含 834 個核苷酸，可轉譯出 278 個胺基酸之蛋白序列；而對應 CP 部分包含有 657 個核苷酸，可轉譯出 219 個胺基酸之蛋白序列。YS1-CP 之核酸序列經登錄於 GenBank 取得核酸分子序號為 KM066122。YS1-CP 與研究室所保存之彩色海芋 CMV-CWF1 分離株 (GenBank Acc. no. KM111300) 以及以往發表之港口馬兜鈴 CMV-Az1 分離株 (Chen *et al*. 2000) 之鞘蛋白胺基酸序列相同度分別達 98.6 及 93.6%，而與 GenBank 上已登錄之其他 3 種 CMV 之鞘蛋白胺基酸序列相同度均達 90% 以上 (表 1)。

此外，以 CMV-up/CMV-dw 引子對 (5'-TATGATAAGAARCTTGTT TCG/5'-GCCGTAAGCTG-GATGGACAA, Singh *et al*. 1995) 就火球花自然罹病葉、YS1 分離株所感染之奎藜局部病斑及菸草 (*N. benthaminana*) 系統性嵌紋病葉、以及馬兜鈴 CMV-Az1 對照組等全量核酸進行 RT-PCR 反應，反應條件如上所述，但引子對黏合溫度為 52℃。結果顯示，上述受測樣品，均可產生預期大小約 485 bp 之核酸片段 (結果未列出)。

根據上述血清反應與核酸分子特性之鑑定結果，由原始罹病火球花組織、YS1 分離株所感染之奎藜局部病斑及菸草系統性嵌紋病

表 1. 火球花 YS1 分離株之鞘蛋白核酸序列與其他 *Cucumber mosaicvirus* (CMV) 病毒之相同度比對。

Table 1. Comparison of the nucleotide (nt) and amino acid (aa) identities of the coat protein of the virus isolate YS1 from blood lily with those of the different isolates of *Cucumber mosaic virus* (CMV).

Virus isolate (Acc. No.)[y]	CP-nt length	% identity of CP[z]	
		nt	aa
YS1 (KM066122)	657	100.0	100.0
Az1 (KJ907379)	654	98.2	93.6
CWF1 (KM111300)	654	97.4	93.2
Y (D12499)	654	92.1	92.2
Ca-P1 (DQ777747)	651	91.6	90.0
Fny (NC001440)	654	92.7	91.8

[z] Percent identities of the respective nucleotide and amino acid sequences were analyzed by the program of Vector NTI Suite (InforMax, Inc., Wisconsin, USA).

[y] The CMV isolates used for comparison are: Az1 from *Aristolochia zolligeriana* Martyn. (Chen *et al*. 2000), CWF1 from calla lily (Acc. no. KM111300), and three other isolates (Y, Ca-P1 and Fny) are available in GenBank.

葉均能同時檢測到 CMV，於此等生化反應結果證實由火球花所分離之 YS1 分離株，屬於 *Cucumovirus* 之胡瓜嵌紋病毒成員。本研究可將 YS1 繁殖於奎藜或菸草之罹病組織作為接種源，但以汁液機械接種法並未能成功將其回接於健康火球花植株造成黃斑病徵，其在田間環境下之是否經由蟲媒而自然傳播與感染尚待釐清。本試驗中比較 25 棵無病徵之火球花葉片組織與分離出 YS1 之火球花黃斑病徵罹病株，進行其 CMV 檢測，結果僅於此出現黃斑病徵之植株樣品可檢出 CMV，並於血清學及核酸分子鑑定試驗證明其為 CMV 病毒分子無誤。本研究之結果乃首次紀錄了火球花為 CMV 之天然寄主。

於開發火球花 CMV-YS1 分離株之核酸快速檢測上，參考 Thomson & Dietzgen (1995) 已發表之 TPS 緩衝液 (100 mM Tris-HCl, 1.0 M KCl, 10 mM EDTA) (Thomson & Dietzgen 1995)，改良其核酸萃取步驟並自行調配一種萃取緩衝液 PSE (0.2 M KPB, 1 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.4) 進行試驗。取 YS1 繁殖於菸草之罹病組織 0.1 g 研磨均質，再與 400 µL 之核酸萃取緩衝液混合均勻，並於 25、40 及 60℃等不同溫度下處理 10 min 後，取此萃取液之上清液再經無菌水稀釋 10 倍後作為 RT-PCR 之模板。所使用之引子對為 CMV-up/CMV-dw，RT-PCR 反應液組成及反應條件如上述。結果顯示，YS1 之菸草罹病組織以 TPS 或 PSE 核酸萃取液所獲得之全量核酸，於 3 種溫度處理者，均能成功於 RT-PCR 反應中檢出 YS1 核酸分子，獲得預期大小 485 bp 之核酸片段 (圖 2A)，與以核酸純化試劑組 (Plant RNA kit GeneMark Technology Co. Ltd., Taiwan) 所得之全量核酸為模板者之結果相同 (圖 2A)。本研究以此核酸快速萃取法進行田間火球花 CMV 罹病組織之 RT-PCR 檢測，也同時能成功檢出此 485 bp 核酸片段 (圖 2B)。此等結果顯示，以 TPS 或 PSE 核酸萃取液作為快速萃取 CMV 罹病組織所得之全量核酸，能成功應用於火球花 CMV 之 RT-PCR 快速檢測。

Thomson & Dietzgen (1995) 簡化了植物組織全量核酸之萃取流程，在不使用 Phenol/Chloroform 等有機溶媒法或是市售核酸純化試劑組條件下，可在不將植物組織均質化之步驟下，透過溫度處理將核酸於短時間內釋出，成功地檢出 DNA 或 RNA 作物病毒。國內研究

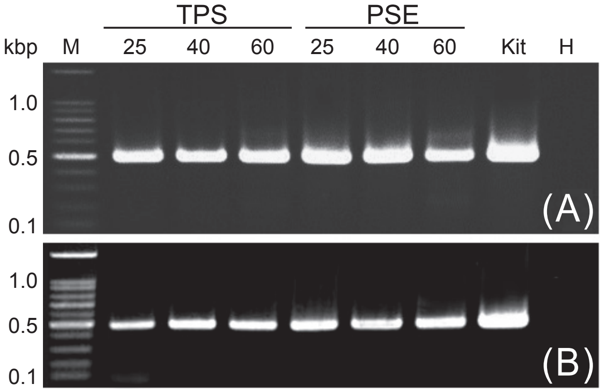

圖 2. 以 TPS 或 PSE 緩衝液進行 *Cucumber mosaic virus* 核酸快速萃取以進行反轉錄-聚合酶連鎖反應結果。(A) 接種 CMV-YS1 之菸草罹病組織；(B) 田間之火球花 CMV 罹病組織。

Fig.2. Reverse-transcription polymerase-chain reaction of *Cucumber mosaic virus* (CMV) by the method of rapid RNA extraction with TPS or PSE buffer. (A) Diseased tissues of *Nicotiana benthaminana* infected with CMV-YS1. (B) Diseased tissues of CMV-infected blood lily in field. The buffers for the extraction of plant total RNAs were TPS buffer (reported by Thomson & Dietzgen 1995) and PSE buffer prepared in this study. A predicted 485-bp DNA fragment was respectively amplified from the diseased total RNAs extracted by the rapid extraction method with the buffers TPS or PSE. Lane M, the molecular marker; Lane 25, 40, and 60, temperature (℃) treated leaf extractions; Lane Kit, leaf extraction by the kit of Plant RNA ; and Lane H, the healthy control.

上，應用 Thomson & Dietzgen (1995) 所開發之 TPS 緩衝液於蘭花病毒 CymMV 和 ORSV (Chen *et al*. 2009) 及筆者應用於花卉病毒檢測上 (Chen *et al*. 2012)，均可快速檢測到病毒核酸分子，然而需視所使用之核酸萃取緩衝液、作物來源及病毒種類而作適當的調整。本研究應用此簡易快速的植物核酸萃取概念與方法並加以改良後，同樣可達到快速檢測火球花 CMV-YS1 病毒之目的；此外，本研究於 25℃ 之室溫條件下便可成功獲得 CMV 之核酸供 RT-PCR 檢測，更可省略定溫加熱器之使用，整體過程簡易快速、省電且環保。

本研究證明以 PSE 核酸萃取液可成功應用於火球花 CMV 之核酸檢測，此等結果可供開發其他植物病毒核酸快速檢測之參考模式。本研究除證明火球花為 CMV 之天然寄主外，並已實務應用於火球花種球之病毒檢定監測，而能使得進口種球之病毒檢疫監測更臻完整。

引用文獻

Ali, A. and M. Kobayashi. 2010. Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in pepper. J. Virol. Methods 163:234–237.

Chen, C. C., C. A. Chang, M. J. Lin, and H. S. Fang. 2000. Identification for the infection of cucumber mosaic cucumoviruson *Aristolochia zolligeriana*. Plant Pathol. Bull. 9:29–34. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C., F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and C. A. Chang. 2012. Application of easy-extraction of plant total RNA on RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus infecting ornamental crops. Plant Pathol. Bull. 21:159. (in Chinese with English abstract)

Chen, S. J., C. C. Chen, T. C. Chen, Y. H. Cheng, and C. A. Chang. 2009. Development and evaluation of nucleic acid quick extraction technique in the detection of orchid viruses. Plant Pathol. Bull. 18:94. (in Chinese with English abstract)

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483.

Edwardson, J. R. and R. G. Christie. 1991. Cucumoviruses. p.293–319. *in*: CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes. (Edwardson, J. R. and R. G. Christie, eds.) CRC Press. Boca Raton. 680 pp.

Francki, R. I. B., D. W. Mossop, and T. Hatta. 1979. *Cucumber mosaic virus*. CMI\AAB, Descriptions of Plant Viruses, No. 213. http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=213 (visit on 7/15/2014)

Hwang, M. S., K. N. Kim, J. H. Lee, and Y. I. Park. 2007. Identification of amino acid sequences determining interaction between the cucumber mosaic virus-encoded 2a polymerase and 3a movement proteins. J. Gen. Virol. 88:3445–3451.

Pacios, L. F. and F. Garcia-Arenal. 2006. Comparison of properties of particles of *Cucumber mosaic virus* and *Tomato aspermy virus* based on the analysis of molecular surfaces of capsids. J. Gen. Virol. 87:2073–2083.

Singh, Z., R. A. C. Jones, and M. G. K. Jones. 1995. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. Plant Dis. 79:713–716.

Thomson, D. and R. G. Dietzgen. 1995. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without homogenization. J. Virol. Methods 54:85–95.

Zitter, T. A. and J. F. Murphy. 2009. *Cucumber mosaic virus*. Plant Health Instructor. http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/Cucumber-mosaic.aspx (visit on 7/15/2014)

Identification and Detection of *Cucumber mosaic virus* Isolated from Bloody Lily (*Haemanthus multiflorus*)

Chin-Chih Chen[1,*] and Fen-Lang Chiang[2]

Abstract

Chen, C. C. and F. L. Chiang. 2015. Identification and detection of *Cucumber mosaic virus* isolated from bloody lily (*Haemanthus multiflorus*). J. Taiwan Agric. Res. 64(1):74–79.

A yellow spot symptom observed on leaves of blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn.) plant was used for virus identification. Later, a virus isolate (YS1) was obtained from single-lesion isolation by mechanical inoculation of this diseased tissue extracts to leaves of *Chenopodium quinoa* Willd. Extracts of the diseased blood lily, local lesions on leaf of *C. quinoa* and systemic mosaic leaf tissues of *Nicotiana benthamiana* caused by YS-1 were all reacted strongly with the antiserum against *Cucumber mosaic virus* (CMV) in indirect enzyme-linked immunosorbent assay. An expected size of 485-bp DNA fragment was amplified from total RNAs of the field blood lily sample, YS1-infected *C. quinoa* and *N. benthamiana* by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the primer pair of CMV-up/CMV-dw. The nucleotide sequence of coat protein (CP) region of YS1 isolate was determined and submitted to the GenBank with the accession number KM066122. The amino acid sequence of YS1-CP shared higher than 90% identity with those of known CMV isolates. Based on the results of serological assay and molecular evidence, it indicated that YS1 isolated from blood lily was an isolate of CMV. Although CMV distributes worldwide and has a large host range. This is the first report to demonstrate that blood lily is a nature host of CMV in Taiwan. Total RNAs of YS1-infected plant tissues obtained by the rapid extraction way with TPS (Thomson & Dietzgen 1995) or PSE buffer (prepared in this study) were all successfully applied on the RT-PCR analysis of YS1. The potential use of the rapid extraction of plant total RNAs for RT-PCR amplification of CMV is proved in this study.

Key words: *Cucumber mosaic virus* (CMV), Blood lily (*Haemanthus multiflorus* Martyn.), Serological assay, Rapid detection with RT-PCR.

Received: July 31, 2014; Accepted: November 12, 2014.
* Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chi-Chung
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chen, Fure-Chyi
Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Guo, Horng-Yuh
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Phathology, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture & Landscape Architecture, National Taiwan University

Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ko, Wen-Hsiung
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Ou, Shyi-Kuan
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Shen, Yuan
Department of Soil & Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Su, Jeng-De
Department of Food Science, Tunghai University

Tsay, Hsin-Sheng
Graduate Institute of Biochemical Sci. & Technol., Chaoyang University of Technology

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Wu, Hung-Pan
Institute of Plant & Microbial Biology, Academia Sinica

Editorial Assistants

Chen, Siang-Jiun
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Lee, Miao-Jyun
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 64 No. 1 March 30, 2015

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042
Press	Airiti Press Inc.
Address	18F., No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330